

INFLUÊNCIA DO IGF-I EM CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DO SÊMEN SUÍNO DESCONGELADO

DAIANE MOREIRA SILVA¹, MÁRCIO GILBERTO ZANGERONIMO², JOSÉ CAMISÃO DE SOUZA³, LUIS DAVID SOLIS MURGAS⁴, EVANDRO CÉSAR PEREIRA CUNHA⁵, CAROLINA DIAS FERNANDES⁶

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado sobre o consumo de frutose pelos espermatozoides, a motilidade, o vigor e a viabilidade espermática. O experimento foi realizado em maio de 2010 na Fazenda São Paulo (Oliveira/MG) e foi coletado um ejaculado de sete varrões. Após a colheita, o sêmen foi congelado e posteriormente descongelado em banho-maria a 50°C por oito segundos. Acrescentaram-se as concentrações de IGF-I ao sêmen e realizou-se análise de motilidade, vigor, viabilidade espermática e consumo de frutose pelos espermatozoides nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação a 37°C. A motilidade espermática do sêmen descongelado no início do período de incubação foi maior ($P < 0,01$) com 100 ng/mL de IGF-I em relação ao controle. Quanto ao vigor, não houve diferença ($P > 0,05$) entre as concentrações de IGF-I. Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) do IGF-I para a viabilidade espermática, sendo 68 ng/mL de IGF-I o melhor nível. Não houve diferença ($P > 0,05$) no consumo de frutose. Conclui-se que o IGF-I pode ser utilizado para melhorar a qualidade das doses inseminantes do sêmen suíno descongelado.

Palavras-chave: Motilidade, Vigor, Viabilidade, Consumo de frutose, Hormônio

INTRODUÇÃO

Atualmente, a suinocultura é a maior atividade pecuária praticada no mundo, representando 100,8 milhões de toneladas do mercado mundial de carnes, de um total de 277,8 milhões, segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação) em 2009. O aumento na produção de carne suína tem demandado animais com elevada eficiência reprodutiva, estando associados também à excelente qualidade de carne de seus descendentes. Com o intuito de melhorar a taxa de fertilização do sêmen destinado a inseminação artificial, diversos estudos têm sido conduzidos. A técnica de congelamento de sêmen suíno não é nova; no entanto, esta não se desenvolveu conforme o esperado, pelo menos até o momento. Apesar disso, pesquisas continuam abordando este tema, pois o domínio do congelamento de sêmen suíno traria vantagens como a importação e exportação de doses de alta qualidade genética ao redor do mundo com menor dificuldade, a perpetuação de espécies nativas (PALLAS & DE ALBAS, 2002) e a garantia de fornecimento constante de sêmen no caso de um problema epidemiológico temporário ou se a produção de sêmen diminuir como resultado de efeitos climáticos adversos (CEROLINI et al., 2001). Além de inúmeras tentativas no aprimoramento de técnicas de manipulação do sêmen em laboratório e protocolos de inseminação, o conhecimento da função dos hormônios reguladores do metabolismo de nutrientes na função reprodutiva dos gametas tem recebido especial atenção nos últimos anos. Sabe-se que o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) desempenha importante papel no controle da função testicular, estando envolvido no desenvolvimento das células germinativas, na maturação e na ativação da motilidade espermática durante a ejaculação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado sobre o consumo de frutose pelos espermatozoides, a motilidade, o vigor e a viabilidade espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de dados

¹Doutoranda em Zootecnia, DZO/UFLA, daianemoreira@hotmail.com

²Professor do DMV/UFLA, zangeronimo@dmv.ufla.br

³Professor do DZO/UFLA, jcamisao@dzo.ufla.br

⁴Professor do DMV/UFLA, lsmurgas@dmv.ufla.br

⁵Graduando em Medicina Veterinária, UFLA, evandrocesar71@hotmail.com

⁶Graduanda em Medicina Veterinária, UFLA, carolfernandes89@yahoo.com.br

O experimento foi realizado em maio de 2010 na Fazenda São Paulo (Oliveira/MG). Foi coletado um ejaculado de sete varrões da genética Agroceres PIC, linhagem 337 TG Superior, com idade entre um e dois anos. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com quatro tratamentos (concentrações de IGF-I) e sete repetições (animais) com parcelas subdivididas no tempo. A colheita do sêmen foi realizada pelo método da mão enluvada com auxílio de manequim fixo. Durante a colheita, foi feita a separação da fração gelatinosa do ejaculado, por meio de camada dupla de papel filtro adaptada ao frasco coletor (bécker graduado protegido por recipiente isotérmico). Após a colheita, o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório, onde foi mantido a 37°C. A metodologia proposta para o congelamento e o descongelamento do sêmen foi modificada do trabalho de Westendorf et al. (1975). Após a colheita e a avaliação rotineira do sêmen *in natura*, o material foi diluído em solução 1:1 com o diluidor BTS. A dose de sêmen foi mantida em temperatura ambiente durante 90 minutos e em seguida foi armazenada em geladeira à 15°C por 180 minutos. Após este período, a solução foi centrifugada (1612,8 g por 10 minutos) para a retirada do plasma seminal. O sedimento de espermatozoides foi ressuspenso em 7,5 mL de diluidor de resfriamento (40 mL de lactose 11%, 10 mL de gema de ovo e 0,005 g de antibiótico - Ampicilina). Em seguida, ajustou-se a concentração espermática para $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Logo após, retirou-se 10 mL que foram resfriados à 5°C durante 90 minutos e posteriormente as amostras foram ressuspenso em 5,0 mL em diluidor de congelamento (28,95 mL de diluidor de resfriamento, 0,15 mL de *Orvus Es Paste - Equex-Paste*, Ref.13760/0030, *Minitüb Afüll-und Labortechnik GmbH & Co.KG* - e 0,9 mL de glicerol), de modo que se obteve concentração final de $1,0 \times 10^9$ espermatozoides/mL. A seguir, o sêmen foi envasado, em palhetas de 0,5 mL à concentração de 500×10^6 espermatozoides/palheta. Posteriormente, as palhetas foram submetidas a curvas de congelamento propostas por Murgas et al. (2001), de 5°C a -5°C, sendo 3°C/min e de -5°C a -140°C, sendo 40°C/min, utilizando vapor de nitrogênio líquido. Em seqüência, as palhetas foram introduzidas em botijão de nitrogênio líquido à temperatura de -196°C, o qual foi transportado para o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal da UFLA, onde se realizou o descongelamento das palhetas em banho-maria a 50°C durante oito segundos. O conteúdo de cada palheta foi diluído em 10 mL de diluidor BTS a 37°C. Em seguida, adicionaram-se as diferentes concentrações de IGF-I humano recombinante (*Human IGF-I 100 µg - BIOVISION - USA*): 0; 50, 100 e 150 ng/mL. Após a adição do hormônio, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação em banho-maria a 37°C através da observação de uma gota de sêmen em microscópio óptico com aumento de 100x. Nos tempos 0 e 120 minutos de incubação, foi realizado o teste de viabilidade espermática através do esfregaço de uma gota de sêmen corada com eosina-nigrosina em lâmina, a qual foi observada em microscópio óptico com aumento de 400x e foi contabilizado o porcentual de células vivas (brancas) e mortas (coradas de rosa) na amostra. Além disso, nesses tempos de incubação foi realizada a análise de concentração de frutose no sêmen de acordo com a metodologia descrita por Lu et al. (2007). Para conhecer a taxa de consumo de frutose pelos espermatozoides, utilizou-se a seguinte equação: concentração de frutose a 0 minuto de incubação – concentração de frutose a 120 minutos de incubação.

Análises estatísticas

Os dados referentes à motilidade e ao vigor espermático foram submetidos à análise não paramétrica e as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Realizou-se análise de variância dos dados obtidos para viabilidade espermática e consumo de frutose após o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias foram submetidas à análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAS (1996) a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade espermática do sêmen descongelado, no início do período de incubação foi maior ($P < 0,01$) quando se adicionou 100 ng/mL de IGF-I do que quando não se adicionou o hormônio (Tabela 1), tendo uma diferença de aproximadamente 10% na motilidade, o que é um aumento significativo considerando a sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo de congelamento/descongelamento. Selvaraju et al. (2009) também verificaram cerca de 10% de aumento na motilidade espermática após a adição de 100 ng/mL de IGF-I no sêmen descongelado de búfalos,

porém, nos períodos 30, 60 e 90 minutos de incubação. Os autores ainda afirmaram que a influência do IGF-I na estimulação da motilidade pode ser devido ao efeito direto nos receptores para IGF-I presentes nos espermatozoides. O tratamento de ratos deficientes em hormônio do crescimento (GH) e de homens sub-férteis com GH melhorou a motilidade espermática, principalmente devido ao aumento da concentração de IGF-I no plasma seminal (OVESEN et al., 1996; BREIER et al., 1998). De forma geral, a motilidade foi mais alta no início do tempo de incubação quando comparada aos 30 minutos e essa, por sua vez, foi superior aos demais tempos de incubação. Quanto ao vigor espermático, não houve diferença ($P>0,05$) entre as concentrações de IGF-I. Esses resultados contrastaram com os encontrados por Hoeflich et al. (1999) que verificaram que touros com baixa qualidade geral do sêmen, apresentaram níveis anormais de IGF-I. Assim como para motilidade, verificou-se diminuição do vigor com o passar do tempo em que o sêmen permaneceu incubado.

Tabela 1 Motilidade (%) e vigor espermático em diferentes períodos de incubação (37°C) após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado (n=7).

IGF-I (ng/mL)	Tempo de incubação (min.)					Média
	0	30	60	90	120	
<i>- Motilidade (%) -</i>						
0	15,00 b	9,17	2,50	3,33	0,83	6,17
50	17,50 ab	10,00	6,67	5,83	1,67	8,33
100	23,33 a	10,83	4,17	3,33	3,33	9,00
150	16,67 ab	11,67	5,00	2,50	0,83	7,33
Média	18,13 A	10,42 B	4,58 C	3,75 C	1,67 C	
P=	0,0000					
<i>- Vigor -</i>						
0	3,00	2,67	0,83	0,83	0,17	1,50
50	3,00	2,50	1,50	1,33	0,50	1,77
100	3,00	2,50	1,17	0,83	1,00	1,70
150	3,00	2,50	1,33	0,83	0,50	1,63
Média	3,00 A	2,54 AB	1,21 BC	0,96 BC	0,54 C	
P=	0,0000					

¹Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P<0,01$)

A viabilidade espermática e o consumo de frutose pelos espermatozoides no sêmen suíno descongelado e adicionado de IGF-I estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 Viabilidade espermática (%) e consumo de frutose pelos espermatozoides (mmol/L) em diferentes períodos de incubação (37°C) após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado (n=7).

Tempo de incubação (min.)	Dose de IGF-I (ng/mL) ¹				Média	P=		
	0	50	100	150		IGF	Incub.	IGF*I.
<i>- Viabilidade espermática -</i>								
0	24,2	21,4	23,6	26,8	24,0 a	0,0173	0,0004	0,5719
120	20,8	17,4	16,4	20,8	18,9 b			
Média ²	22,5	19,4	20,0	23,8				
CV (%)	10,2							
<i>- Consumo de frutose -</i>								
	8,48	7,27	6,08	6,54	7,09	23,04		

¹Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ($P<0,05$)

²Regressão quadrática significativa ($P<0,05$)

Observou-se efeito quadrático ($P<0,05$) do IGF-I sobre a viabilidade espermática, sendo 68 ng/mL o melhor nível do hormônio para esta variável. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Liu et al. (1991) que afirmaram que a ação do IGF-I como antioxidante resulta em

aumento da viabilidade espermática. Não houve diferença ($P>0,05$) para o consumo de frutose. Esse resultado foi diferente do encontrado por Selvaraju et al. (2009), pois houve aumento no consumo deste carboidrato aos 30 e 60 minutos de incubação, explicando o aumento da motilidade espermática nesse mesmo trabalho.

CONCLUSÃO

A adição de 100 e 68 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno descongelado aumenta respectivamente, a motilidade e a viabilidade espermática, no entanto a adição de IGF-I não influencia o vigor espermático e o consumo de frutose pelos espermatozoides.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BREIER, B. H.; VICKERS, M. H.; GRAVANCE, C. G.; CASEY, P. J. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? **Endocrinology**, J. 45 (Suppl.), S53–S60, 1998.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.

FAO Database 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=nutrition>>. Acessado em: 28/07/2009.

HOEFLICH, A.; WU, M.; MOHAN, S.; FÖLL, J.; WANKE, R.; FROEHLICH, T.; ARNOLD, G. J.; LAHM, H.; KOLB, H. J.; WOLF, E. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5488-5496, dec. 1999.

LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 231–239, 1991.

LU, J. C.; CHEN, F.; XU, H. R.; HUANG, Y. F.; LU, N. Q. Standardization and quality control for determination of fructose in seminal plasma. **Journal of Andrology**, v.28, n.2, 2007.

MURGAS, L. D. S.; SELLÉS, E.; GADEA, J.; RUIZ, S. Crioconservación espermática en la especie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospermico. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: ABRAVES, 2001.

OVESEN, P.; HO, K. Y.; ORSKOV, H.; JORGENSEN, J. O.; INGERSLEV, J.; CHRISTIANSEN, J. S. GH treatment of subfertile males. **Fertility and Sterility**, v. 66, p. 292–298, 1996.

PALLAS, R; DE ALBA, C. Impacto de las nuevas tecnologías de Inseminación Artificial en la gestión de un centro de inseminación artificial. **Venezuela Porcina**, v. 16, n. 46, p. 15-16, 2002.

SAS. SAS User's Manual, **Statistical Analyses System Institute**, Cary, NC, 1996.

SELVARAJU, S.; REDDY, I. J.; NANDI, S.; RAO, S. B. N.; RAVINDRA, J. P. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 113, n. 1-4, p.60-70, jun. 2009.

WESTENDORF, P. et al. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor - und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.82, p.261-267,1975.