

**QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN SUÍNO APÓS O CONGELAMENTO POR
DIFERENTES MÉTODOS**

GUILHERME OBERLENDER¹, MÁRCIO GILBERTO ZANGERONIMO², LUIS DAVID SOLIS MURGAS³, LUIZ GUSTAVO PESSOA ROCHA⁴, BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA⁵, DAIANE MOREIRA SILVA⁶

RESUMO

O aperfeiçoamento das técnicas de congelamento acarreta um ganho ao setor de reprodução suína, refletindo em melhora da cadeia produtiva. Este trabalho teve o objetivo de analisar a qualidade espermática do sêmen suíno após o congelamento por diferentes métodos. As metodologias estudadas foram as propostas por Westendorf et al. (1975) (WE) e Paquignon et al. (1974) (PA) e não diferiram ($P>0,05$) nos parâmetros motilidade e vigor espermáticos, resistência osmótica, total de anormalidades morfológicas e taxa de degradação da motilidade. Para o parâmetro viabilidade espermática, houve diferença ($P<0,05$), sendo que a metodologia de Westendorf et al. (1975) apresentou médias superiores, evidenciando assim, maior efeito crioprotetor quando comparado com a metodologia de Paquignon et al., (1974). A metodologia de congelamento WE proporciona maior viabilidade espermática após o descongelamento do sêmen suíno do que a metodologia PA.

Palavras-chaves: Biotecnologia, Criopreservação, Espermatozóide, Reprodução

INTRODUÇÃO

O uso do sêmen suíno congelado ainda não tem sido aplicado ao sistema de produção. Por possuir características diferentes de outras espécies animais, principalmente no que se refere à composição da membrana dos espermatozoides, o sêmen suíno apresenta maior susceptibilidade ao choque pelo frio durante o processo de congelamento e ao choque térmico no descongelamento (ANTUNES, 2007), eventos estes responsáveis pela baixa viabilidade quando descongelado. Enquanto o sêmen resfriado entre 15 e 18 °C é conservado até três a cinco dias e se consegue médias anuais de taxas de parto acima de 88% e nascidos totais acima de 10 leitões, com sêmen congelado, as taxas de parto não alcançam estes valores (ROMERO et al., 2004). Assim, o uso do sêmen congelado de varrões representa apenas 1% do sêmen usado a nível mundial, apesar de o mesmo estar disponível para o uso desde 1975 (SARAVIA et al., 2005), existindo diferentes metodologias de congelamento e descongelamento. Visando o avanço e aplicabilidade da técnica de congelamento, o objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros da qualidade espermática após o descongelamento do sêmen suíno quando congelado conforme duas metodologias distintas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, em julho de 2010, sete reprodutores suínos pertencentes a Fazenda São Paulo e ao Centro Experimental de Suínos do Departamento de Zootecnia da UFLA. Foi coletado um ejaculado de cada animal pelo método da mão enluvada com auxílio de manequim fixo. Após a

¹Médico Veterinário, Doutorando em Zootecnia, DZO/ UFLA, guilherme_oberlender@yahoo.com.br

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

³Professor Associado, DMV/UFLA, lsmurgas@ufla.br

⁴Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, lgvetp@yahoo.com.br

⁵Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, babi_azevedo123@hotmail.com

⁶Zootecnista, Doutoranda em Zootecnia, DZO/UFLA, daianemoreira@hotmail.com

colheita, o sêmen foi levado ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal (DMV-UFLA), onde foi congelado conforme modificação das metodologias propostas por Westendorf et al. (1975) (WE) e por Paquignon et al. (1974) (PA).

Na metodologia WE, primeiramente o sêmen foi diluído em meio BTS na proporção 1:1 (sêmen/diluidor) e feito a adaptação à temperatura ambiente por 90 minutos. Posteriormente, resfriado a 15°C por 180 minutos e somente após atingir os 15°C, por meio da centrifugação, foi retirado o plasma seminal. O pellet de espermatozoides foi então re-suspenso em diluidor de resfriamento (80% de solução de lactose 11% e 20% de gema de ovo) e resfriado a 5°C por 90 minutos. Após esse período, foi adicionado o diluidor de congelamento (89,5% de diluidor de resfriamento, 1,5% de Orvus ex Paste, Equex-Paste, Ref.13560/0030, Minitüb Afüll-und Labortechnik GmbH & Co.KG e 9% de glicerol) e realizado o envase das amostras.

Na metodologia de PA, imediatamente após a colheita, o sêmen foi centrifugado para retirada do plasma seminal e re-suspenso no diluidor de resfriamento (5,67% de glicose e 22,5% de gema de ovo). O sêmen diluído foi então mantido a temperatura ambiente por 120 minutos e após resfriado a 15°C por 180 minutos. Após passado o tempo e atingido os 15°C, o diluidor de congelamento (91% de diluidor de resfriamento – PA e 9% de glicerol) foi adicionado ao sêmen realizado o envase do mesmo.

O envase do sêmen foi realizado em palhetas de 0,5 mL, contendo uma concentração de 500×10^6 de espermatozoides em cada e, em seguida, as mesmas foram introduzidas em vapor de nitrogênio para o resfriamento, seguindo a curva de congelamento proposta por Murgas et al. (2001), de 5°C a -5°C a 3°C/min. e de -5°C a -140°C a 40°C/min. Posteriormente, as palhetas foram introduzidas em nitrogênio líquido a temperatura de -196°C.

O descongelamento das palhetas de sêmen foi realizado em banho-maria a 50°C por oito segundos. Ao sêmen descongelado foi então adicionado de diluidor BTS a 37°C. As análises de motilidade e vigor foram realizadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação a 37°C. Nos tempos 0 e 120 minutos de incubação, foram também realizadas as análises de viabilidade espermática, taxa de resistência osmótica (TRO), morfologia espermática e taxa de degradação da motilidade (TDM). Desta forma, foi então utilizado um delineamento em blocos ao acaso (animais experimentais) em esquema fatorial 2x5 (dois protocolos avaliados em cinco momentos após o descongelamento - incubação) para motilidade e vigor espermático e 2x2 (dois protocolos avaliados em dois momentos) para viabilidade, taxa de resistência osmótica e parâmetros morfológicos.

A motilidade e vigor espermáticos foram mensurados utilizando-se a média de dois avaliadores que observaram uma gota de sêmen entre uma lâmina e lamínula pré-aquecidas e analisada em microscópio óptico em aumento de 400x. O valor de motilidade foi dado em porcentagem e, de vigor, valores de 1 a 5. Para o teste de viabilidade espermática, misturou-se uma gota do corante eosina-nigrosina com uma gota de sêmen e, em seguida, elaborou-se um esfregaço em lâmina sob placa aquecedora. Posteriormente, foi examinado ao microscópio óptico com aumento de 400x, o percentual de espermatozoides vivos (sem coloração) e mortos (absorvem o corante e ficam róseos). Para taxa de degradação de motilidade (TDM) foi utilizada a seguinte fórmula: (vigor a 10 minutos de incubação – vigor a 2 horas de incubação) / vigor a dez minutos de incubação x 100. Para o taxa de resistência osmótica (TRO), foram adicionados 100 µL de sêmen em 1,0 mL de solução hiposmótica (150 mOs/L), a mistura foi incubada por 40 minutos a 37°C e se realizou a contagem de 100 células em microscópio de contraste de fases com aumento de 1000x. O cálculo das formas reativas seguiu a fórmula: (% de anormalidades na cauda após o TRO) - (% de anormalidades na cauda antes do TRO). A análise da morfologia espermática foi realizada a partir da contagem de 100 espermatozoides em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x.

Análise estatística

Os dados de viabilidade, resistência osmótica e total de anormalidades morfológicas foram transformados pela opção raiz quadrada para atingirem a normalidade (Shapiro Wilk), sendo as médias comparadas pelo teste F. Adotou-se significância quando $P < 0,05$. Para motilidade e vigor espermático, foi aplicado o teste não paramétrico (qui-quadrado) e as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Todo procedimento estatístico foi realizado utilizando o pacote estatístico SAS (1996).

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à viabilidade, resistência osmótica e morfologia espermática estão apresentados na Tabela 1. Houve diferença ($P < 0,05$) entre a viabilidade espermática das duas metodologias estudadas, sendo que a metodologia de WE apresentou viabilidade maior que a proposta por PA. Essa maior viabilidade pode ser explicada pelo fato de que na metodologia proposta por Westendorf et al. (1975) o plasma seminal permaneceu até que a temperatura do sêmen atingisse 15°C (MARTINS et al., 2005) e também pelo fato de ocorrer menor exposição ao glicerol no pré-congelamento, pois esse pode apresentar efeito citotóxico (ALMLID & JOHNSON, 1988), mantendo então, de uma maneira mais eficaz, a crioproteção física dos espermatozoides. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as metodologias para o teste de resistência osmótica e a morfologia espermática, demonstrando que os dois protocolos agem de maneira semelhante na preservação da integridade funcional da membrana espermática.

Tabela 1 – Viabilidade espermática (%), resistência osmótica (%) e total de anormalidades morfológicas (%) do sêmen suíno descongelado utilizando-se diferentes metodologias de congelamento (n=7)

Metodologia	Tempo (minutos)		Média	P=		
	0	120		Metodologia	Tempo	M*T
	- Viabilidade (%) -			0,0324	0,0001	0,4108
A	69,3	47,9	58,6 A			
B	60,4	32,6	46,5 B			
Média	64,8 a	40,2 b				
CV (%)	14,64					
	- Resistência osmótica -			0,2001	0,017	0,8541
A	17,8	12,0	14,9			
B	20,7	13,3	17,0			
Média	19,2 a	12,6 b				
CV (%)	16,14					
	- Alterações morfológica -			0,6467	0,0026	0,4759
A	16,3	20,4	18,3			
B	15,7	22,3	19,0			
Média	16,0 a	21,3 b				
CV (%)	11,36					

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

A motilidade e o vigor espermáticos estão apresentados na Tabela 2. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a motilidade espermática das duas metodologias. Esse resultado é diferente do encontrado por Martins et al. (2005), que encontraram valores de motilidade no sêmen congelado conforme a metodologia Westendorf et al. (1975) que na proposta por Paquignon et al., (1974). Também não houve diferença ($P > 0,05$) para o vigor espermático, sendo que em ambas as metodologias ocorreu a diminuição do vigor espermático no decorrer dos tempos de avaliação.

Tabela 2 – Motilidade (%) e vigor espermáticos do sêmen suíno descongelado utilizando-se diferentes metodologias de congelamento (n=7)

Metodologia	Tempo (minutos)					Média
	0	30	60	90	120	
	- Motilidade espermática (%) -					
Westendorf	34,4	21,3	10,0	2,5	0,6	13,8
Paquignon	35,0	20,7	10,7	5,7	0,7	14,6
Média	34,7 a	21,0 b	10,4 c	4,1 c	0,7 c	
P =	0,0001					

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

Continua...

- Vigor espermático -						
Westendorf	3,00 a	2,63 a	1,50 b	0,38 c	0,13 d	1,53
Paquignon	3,00 a	2,57 b	1,86 c	0,71 d	0,14 e	1,66
Média	3,00	2,60	1,68	0,54	0,13	
P =	0,0001					

¹Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Na Tabela 3, encontram-se os dados referentes à taxa de degradação da motilidade. Pode-se observar que não houve diferença (P>0,05) entre as taxas de degradação da motilidade das duas metodologias analisadas.

Tabela 3 - Taxa de degradação da motilidade – TDM (%) do sêmen suíno descongelado utilizando-se diferentes metodologias de congelamento (n=7)

	Metodologia		Média
	Westendorf	Paquignon	
TDM	96,9	95,2	96,1
P =	0,7781		

CONCLUSÃO

A metodologia de congelamento WE proporciona maior viabilidade espermática após o descongelamento do sêmen suíno do que a metodologia PA.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

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**, v. 66, p. 2899-2905, 1988.

ANTUNES, R. C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 60-63, 2007.

MARTINS, N. O.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N.; PIASSI, L.; MIRAPALHETA, E.; PERONDI, A.; CORCINI, C. D.; COREZZOLLA, J. L. **Métodos de congelamento para sêmen suíno e seus efeitos na motilidade espermática**. In: XIV Congresso de Iniciação Científica e VII Encontro da Pós-Graduação da UFPA, 2005, Pelotas – Paraná. Anais... Pelotas: UFPA, 2005. p. 1.

MURGAS L. D. S.; SELLÉS, E.; GADEA, J.; RUIZ, S. Crioconservación espermática en la especie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospérmico. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2001, Porto Alegre – Rio Grande do Sul. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001. p. 30.

PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M.; DU MESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. **Journées de la Recherche Porcine en France**, v. 6, p. 71-76, 1974.

ROMERO, C.; ALBA, C.; MARTINEZ, P. C.; PASCUAL, M. A. H. Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. **Suínos & Cia**, v. 2, n. 6, p. 28-33, 2004.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINES, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1320-1333, 2005.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

The SAS – Statistical Analysis System: system for Windows [computer program]. Version 6.12. **Cary (NC): SAS; 1996.**

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur tiefgefrierung von ebersperma. **Dtsch. Tierarztz. Wacherisch**, v. 82, p. 26-67, 1975.