



## 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

*O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios*

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



### **Criopreservação de sêmen suíno em sistema automatizado comparando diferentes soluções crioprotetoras**

Carolina Gonzales da Silva<sup>1</sup>, Elisa Ribeiro da Cunha<sup>2</sup>, Sônia Nair Bão<sup>3</sup>, Guilherme dos Reis Blume<sup>4</sup>, Renato Marques Rosa de Oliveira<sup>4</sup>, Carlos Frederico Martins<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de apoio da FAPDF. e-mail: [carolgonzaless@gmail.com](mailto:carolgonzaless@gmail.com)

<sup>2</sup>Bolsista de apoio do CNPq. e-mail: [ercunha@gmail.com](mailto:ercunha@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade de Brasília. e-mail: [snbao@unb.br](mailto:snbao@unb.br)

<sup>4</sup>Bolsista de iniciação científica da FAPDF. e-mail: [guiblume@gmail.com](mailto:guiblume@gmail.com)

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: [carlos.frederico@cpac.embrapa.br](mailto:carlos.frederico@cpac.embrapa.br)

**Resumo:** A criopreservação de sêmen é um processo ineficiente na espécie suína, pois existe grande variação entre indivíduos e entre proporções do mesmo ejaculado. Além disso, a estrutura de membrana plasmática dos espermatozoides dificulta a padronização da técnica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi buscar melhorias na qualidade do sêmen suíno criopreservado. Para isso, foram realizados nove congelamentos com três crioprotetores associados a três meios base, constituindo nove tratamentos diferentes. O sêmen foi processado e congelado em curva controlada em máquina TK-3000. Após o descongelamento foram realizadas avaliações de motilidade, vigor, morfologia espermática, integridade de membrana e de acrossoma. Os melhores resultados foram obtidos em todos os parâmetros quando foi utilizado o glicerol como crioprotetor interno, independente do meio base, e na associação da dimetilformamida (DMF) com água de coco. As médias referentes à morfologia espermática não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos. Bons resultados foram obtidos com o novo método de congelação automatizada, demonstrando a possibilidade de congelar sêmen em grande escala e difundir a utilização de sêmen suíno criopreservado.

**Palavras-chave:** biotecnologia, inseminação artificial, sêmen, suíno

### **Cryopreservation of boar semen in automatized system comparing different crioprotectants solutions**

**Abstract:** The semen cryopreservation is an inefficient process in the swine specie, because there are great variation between animals and proportions of de same ejaculate. In addition, the plasm membrane structure difficult the standardization of the technique. Therefore, the objective this study was to improve the quality of the cryopreserved boar semen. For this, was performed nine freezing of semen with three cryoprotectant molecules associated to three base mediums, constituting nine different treatments. The semen was processed and frozen in controlled curve in TK-3000 machine. The samples were thawed and realized evaluations of motility, vigor, sperm morphology, membrane and acrosome integrity. The best results were obtained in all the parameters when utilized the cryoprotectant glycerol, independent of the base medium, and in the association of the DMF with coconut water. The mean of sperm morphology doesn't demonstrated significant difference between the treatments. Good results were obtained with the new method of automatized freezing, demonstrating the possibility of freezing semen in large scale and diffuse the cryopreserved boar semen utilization.

**Keywords:** artificial insemination, biotechnology, boar, semen

#### **Introdução**

A criopreservação de sêmen é um processo bem sucedido em muitas espécies de mamíferos, porém em suínos ainda é ineficiente. A grande variação individual entre reprodutores e entre proporções do ejaculado (Flores et al., 2009), bem como a composição dos espermatozoides dificultam o estabelecimento de um protocolo de congelação padronizado. Já existem relatos de nascimento de leitões provenientes de sêmen sexado (Abeydeera et al., 1998) ou inseminação artificial intrauterina profunda com sêmen criopreservado (Grossfeld et al., 2005), porém os resultados estão distantes da



## 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

*O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios*

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



inseminação com sêmen resfriado. Desta forma, faz-se necessário o estabelecimento de um processo de congelamento mais simples e com índices satisfatórios após o descongelamento. O objetivo deste trabalho foi oferecer um método mais simples de congelamento e prever qual a melhor solução crioprotetora para a conservação do sêmen suíno.

### Material e Métodos

Foram utilizados três reprodutores híbridos comerciais de fertilidade conhecida. Foram efetuados três congelamentos de cada animal, totalizando nove congelamentos.

Os meios de congelamento foram constituídos de três crioprotetores (glicerol 3%, DMF 5% e a combinação destes dois), associados a três meios base (água de coco, trealose e lactose adicionados com gema de ovo), formando nove tratamentos diferentes.

O sêmen foi coletado utilizando o método da mão enluvada, e a fração livre de gel foi diluída (1:1) em solução de BTS (Pursel & Jonson, 1975), permanecendo durante uma hora a 24°C. O sêmen foi centrifugado; o sobrenadante foi desprezado e adicionado ao *pellet* a quantidade suficiente de meio de resfriamento (80% de lactose a 11% e 20% de gema de ovo) para que a concentração de  $450 \times 10^6$  spz/mL fosse alcançada. Em seguida foram adicionadas separadamente as nove soluções de congelamento para que a concentração atingisse  $300 \times 10^6$  spz/mL. Então, realizou-se o envase dos tratamentos em palhetas de 0,25mL e a congelamento em máquina TK-3000. A curva de refrigeração apresentou a diminuição de 0,25°C/min até atingir 5°C. As amostras permaneceram nesta temperatura por 2 horas, até iniciar a curva negativa, com diminuição de 20°C/min até atingir -120°C, quando as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido.

O descongelamento foi realizado a 36°C/30s, e o conteúdo ressuspense em solução fisiológica na mesma temperatura.

Foram realizadas as avaliações de motilidade, vigor e morfologia espermática em microscópio de contraste de fase, e a avaliação de integridade de membrana e acrossoma por sondas fluorescentes.

Para a análise estatística foi utilizado inicialmente análise de variância e depois o teste de Tukey para comparação entre tratamentos. Foi considerado significativo o resultado menor que 0,05.

### Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações realizadas após o descongelamento do sêmen suíno encontram-se na Tabela 1. Os tratamentos que demonstraram os maiores valores quando avaliou-se os parâmetros motilidade, vigor, espermatozoides com membrana íntegra e sem reação acrossomal, foram os que utilizaram o glicerol como crioprotetor, independente do meio base combinado. Porém, quando a DMF foi utilizada associada com água de coco como diluidor, os resultados foram semelhantes aos obtidos com os meios com glicerol, não havendo diferença significativa entre estes tratamentos. Esses dados são conflitantes com os encontrados por Bianchi (2007), onde melhores resultados de motilidade e de integridade de membrana foram demonstrados quando utilizada a DMF como crioprotetor em relação ao glicerol. Porém vale ressaltar que as curvas de congelamento foram diferentes entre os experimentos.

Quando se avaliou a porcentagem de espermatozoides patológicos, os valores encontram-se muito próximos e não havendo diferença significativa entre os tratamentos.



## 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



Tabela 1- Resultados das avaliações subjetivas de motilidade e vigor, porcentagem de células anormais no exame de morfologia por contraste de fase, porcentagem de células com membrana íntegra e com acrossoma intacto por avaliação fluorescente. Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

Tratamentos	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Células anormais (%)	Membrana íntegra (%)	Acrossoma intacto (%)
1	30,27 ± 7,55 <sup>c</sup>	2,0 ± 0,61 <sup>c</sup>	18,5 ± 8,85 <sup>a</sup>	31,05 ± 12,75 <sup>c</sup>	62,77 ± 11,85 <sup>c</sup>
2	38,88 ± 10,39 <sup>ac</sup>	2,56 ± 0,44 <sup>a</sup>	21,05 ± 9,98 <sup>a</sup>	37,02 ± 9,51 <sup>ac</sup>	71,05 ± 8,37 <sup>ac</sup>
3	21,11 ± 9,04 <sup>bc</sup>	2,06 ± 0,54 <sup>ac</sup>	18,63 ± 8,57 <sup>a</sup>	16,41 ± 7,6 <sup>b</sup>	51,97 ± 9,54 <sup>bc</sup>
4	19,44 ± 9,66 <sup>bc</sup>	1,69 ± 0,58 <sup>bc</sup>	18,30 ± 8,49 <sup>a</sup>	20,75 ± 9,88 <sup>bc</sup>	56,5 ± 12,74 <sup>bc</sup>
5	36,11 ± 11,67 <sup>ac</sup>	2,44 ± 0,56 <sup>a</sup>	19,00 ± 7,52 <sup>a</sup>	40,58 ± 9,05 <sup>ac</sup>	72,69 ± 8,00 <sup>ac</sup>
6	19,44 ± 7,98 <sup>bc</sup>	1,94 ± 0,54 <sup>bc</sup>	19,63 ± 7,15 <sup>a</sup>	18,5 ± 8,50 <sup>bc</sup>	49,75 ± 11,6 <sup>bc</sup>
7	24,05 ± 13,08 <sup>bc</sup>	2,08 ± 0,59 <sup>bc</sup>	19,36 ± 7,72 <sup>a</sup>	22,83 ± 10,18 <sup>bc</sup>	58,91 ± 13,05 <sup>bc</sup>
8	37,22 ± 7,85 <sup>ac</sup>	2,66 ± 0,43 <sup>a</sup>	20,05 ± 7,28 <sup>a</sup>	41,75 ± 7,42 <sup>ac</sup>	73,13 ± 6,87 <sup>ac</sup>
9	18,77 ± 10,30 <sup>bc</sup>	1,91 ± 0,71 <sup>bc</sup>	19,00 ± 7,52 <sup>a</sup>	19,30 ± 9,46 <sup>bc</sup>	52,83 ± 9,29 <sup>bc</sup>

Tratamentos: 1: água de coco e dimetilformamida (DMF); 2: água de coco e glicerol; 3: água de coco e DMF+glicerol; 4: trealose e DMF; 5: trealose e glicerol; 6: trealose e DMF+glicerol; 7: lactose e DMF; 8: lactose e glicerol; 9: lactose e DMF+glicerol. Nas linhas, letras diferentes representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos.

### Conclusões

A criopreservação com curva controlada em máquina demonstrou resultados satisfatórios e grande praticidade, representando um avanço na conservação de sêmen suíno e possibilitando, futuramente, a grande difusão do material genético de um reprodutor superior e a utilização do sêmen criopreservado em escala comercial. Com esta curva, os meios com glicerol e DMF associada à água de coco apresentaram a qualidade espermática superior às outras soluções. Porém, experimentos *in vivo* ainda são necessários para comprovar a eficácia da técnica de congelamento.

### Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e à Embrapa Cerrados pelo suporte financeiro.

### Literatura citada

- ABEYEDDEERA, L.R.; JOHNSON, L.A., WELCH, G.R. et al. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. **Theriogenology**, 1998.
- BIANCHI, I. **Congelamento de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extracelulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade**. 2007. 94f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A. et al. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.72, p.784-797, 2009.
- GROSSFELD, R.; KLINC, P.; SIEG, B. et al. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. **Theriogenology**, 2005.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v.40, n.1, p.99-102, 1975.