

Utilização de diferentes meios de ressuspensão para o sêmen do varrão após descongelação

Use of different means of the boar semen dilution after thawing

Ricardo Toniolli,* Michelle Costa e Silva,* Roberta Nogueira Chaves*

Resumo

A pesquisa brasileira com sêmen congelado em suínos é recente e apesar de bons níveis de eficiência, ainda não conseguiu obter resultados economicamente viáveis. Este trabalho teve por objetivo testar diferentes diluentes para a ressuspensão do sêmen após descongelação. Três machos foram coletados, em recipiente de 500 mL coberto por gaze para separação da parte gelatinosa e protegido por envoltório térmico. Cada amostra continha 112×10^6 spz/mL para as análises *in vitro*. A técnica de Paquignon foi utilizada para a congelamento do sêmen. Após a descongelação, a 37°C durante 30 segundos, o conteúdo de cada palheta foi ressuspensão: 1) Beltsville Thawing Solution (BTS – controle); 2) BTS + ácido 3-indol acético (IAA = 10 ng/mL); 3) Androhep (ADH) e 4) Água de coco (COCO) + antibiótico. Foram avaliadas em microscopia óptica a motilidade e vigor espermático após cinco minutos e duas horas de incubação a 37°C. Foram feitos esfregaços de sêmen aos 5 minutos de incubação para avaliação da morfologia do acrossoma, de acordo com a seguinte classificação: normal (NAR); em processo de perda (PAR); sem acrossoma (SAR); com defeito (DAR); com edema (EAR). Foi utilizado o teste de Mann Whitney através do General Linear Models do programa Statistical Analysis System (SAS 6.03, 1988) a 5% ($p < 0,05$). Os diluentes BTS e IAA obtiveram os melhores resultados de vigor (2,2 e 2,1, respectivamente) e motilidade espermática (41,9 e 6,5%, respectivamente). As análises morfológicas indicaram o ADHP e o IAA com os melhores resultados de NAR (65,7 e 59,5%, respectivamente).

Palavras-chave: congelamento, sêmen, suíno, diluente.

Abstract

The Brazilian research with swine frozen semen is recent and in spite of a good efficiency levels, it didn't still get the results economically viables. This work had for objective to test different extenders for the semen dilution after descongelation. Three males were collected, in recipient with 500 mL covered by filter for separation of the gelatinous part and protected by thermal wrapper. Each sample contained 112×10^6 spz/mL for the *in vitro* analyses. The Paquignon technique was used for the semen freezing. After the descongelation at 37°C during 30 seconds, the content of each slat was diluted: 1) Beltsville Thawing Solution (BTS – control); 2) BTS + acid 3-indol acetic (IAA = 10 ng/mL); 3) Androhep (ADH) and 4) Coconut Water (COCO) + antibiotic. They were analysed in optical microscopy the spermatic motility and vigour after five minutes and two hours of incubation at 37°C. For the acrosome morphologic evaluation, they were made the semen scrub after five minutes of incubation, in agreement with the following classification: normal (NAR); in loss process (PAR); without acrosome (SAR); with defect (DAR); with edema (EAR). The Mann Whitney's test was used with the Lineal General Models in the Statistical Analysis System Program (HEALTHY 6.03, 1988) at 5% ($p < 0,05$). The BTS and IAA extenders obtained the best vigour (2.2 and 2.1, respectively) and spermatic motility results (41.9 and 6.5%, respectively). The morphologic analyses indicated the ADHP and IAA extender with the best results of NAR (65.7 and 59.5%, respectively).

Keywords: freezing, semen, swine, extender.

Introdução

Os primeiros trabalhos de congelamento do sêmen do varrão começaram nas décadas de 1950-60. Em 1970, Polge et al. demonstraram a possibilidade de se preservar uma boa fertilidade do sêmen congelado através de inseminações feitas por via cirúrgica, diretamente no oviduto de marrãs em estro. Vários autores (Crabo e Einarsson, 1971; Graham et al., 1971; Pursel e Johnson, 1971) também conseguiram manter um nível de fertilidade aceitável através de inseminações intracervicais. Considerações técnicas, tais

como diluentes, avaliação da célula espermática, tempo de inseminação, volume a ser inseminado e eficiência da técnica são importantes no sucesso da inseminação artificial em suínos (Johnson et al., 2000).

A susceptibilidade dos espermatozoides de mamíferos ao resfriamento varia de acordo com a espécie (Watson e Plummer, 1981). A sensibilidade peculiar da célula espermática suína apresenta problemas práticos e científicos na criopreservação do sêmen (Wilmot e Polge, 1972; Salamon et al., 1973). Portanto, torna-se necessário a compreensão

* Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi. CEP 60 740-000, e-mail: toniolli@roadnet.com.br.

dos danos causados pelo estresse térmico e das respostas dos espermatozoides ao resfriamento, no desenvolvimento de métodos para a congelação do sêmen de mamíferos (Bwanga, 1991).

A pesquisa brasileira no setor é recente, porém alcança níveis de eficiência no domínio da tecnologia comparável aos de outros países. Trabalhos iniciais permitiram avaliar os resultados técnicos da aplicação do sêmen congelado importado (Scheid et al., 1986). Entretanto, seu emprego é ainda esporádico e limitado a praticamente programas de melhoramento e trabalhos experimentais (Scheid et al., 1982). Embora a tecnologia venha sendo aprimorada, os resultados da aplicação dos métodos de conservação do sêmen suíno são ainda insuficientes, apresentando níveis mais baixos de fecundidade em relação à monta natural ou à inseminação artificial utilizando sêmen resfriado. Vários diluentes têm sido desenvolvidos, sendo a maioria para protocolos particulares, de forma que eles geralmente não são transferíveis de um método para outro (Osinowo e Salamon, 1976). Este trabalho teve por objetivo testar diferentes diluentes para a ressuspensão do sêmen suíno após descongelamento.

Material e métodos

Machos e ejaculados

Três machos de raças puras (1 Landrace e 2 Duroc), foram coletados 20 vezes cada um, através da técnica da mão enluvada em recipiente com capacidade para 500 mL coberto por uma gaze própria para separação da parte gelatinosa e protegido por envoltório térmico. Foram realizadas duas coletas por semana (2ª e 5ª-feira), sendo utilizado apenas o ejaculado da segunda coleta. Os reprodutores passaram por exames espermáticos prévios, encontrando-se dentro dos padrões fisiológicos ideais determinados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998): células anormais d" 20%. Cada ejaculado (sêmen *in natura*) foi avaliado através do vigor espermático (notas de 0 a 5) e motilidade (0 a 100%), sendo utilizados para o experimento apenas os que apresentaram valores mínimos de 3,0 e 70%, respectivamente.

Sêmen, congelação e diluentes

Cada palheta continha uma concentração de 112×10^6 spz/mL para as análises *in vitro*. A técnica utilizada para a congelação do sêmen foi a de Paquignon et al. (1974). O sêmen foi envazado em palhetas com capacidade para 0,5 mL, devidamente identificadas. A descongelamento foi feita em água a uma temperatura de 37°C na qual foi mergulhada cada palheta durante 30 segundos. Após a descongelamento, o conteúdo de cada palheta foi ressuspensão nos diferentes diluentes (2 mL) a serem testados: 1) Beltsville Thawing Solution (BTS – controle); 2) BTS adicionado do ácido 3-indol acético (IAA = 10 ng/mL); Androhep (ADH) e água de coco (ACP) adicionada de antibiótico (gentamicina a 80 mg/100mL), incubados em banho-maria a 37°C, recompondo desta forma seu volume final (2,5 mL) para procedimento das análises.

Características avaliadas

Foram avaliadas as características de motilidade espermática (resultado em percentagem) e vigor espermático (notas

de 0 a 5 – Toniolli, 1996) com leituras feitas à luz da microscopia óptica após cinco minutos e duas horas de incubação do sêmen a 37°C. Foram feitos esfregaços de sêmen aos 5 minutos de incubação para avaliação das características morfológicas do acrossoma, de acordo com a seguinte classificação: normal (NAR); em processo de perda (PAR); sem acrossoma (SAR); com defeito (DAR) e com edema (EAR). Essas avaliações foram feitas ao microscópio óptico em um aumento de 1000x com contraste de fase, não havendo necessidade de coloração específica.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com a análise estatística feita pela avaliação das médias e desvios-padrões, com aplicação de testes de análise de variância. O teste proposto foi o de Mann Whitney para a comparação entre grupos. A análise das diferenças entre médias foi feita por variância multifatorial usando-se o General Linear Models do programa Statistical Analysis System (SAS 6.03, 1988), com um intervalo de confiança de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Nas Figuras 1 e 2 podem ser vistos os resultados médios para as características de vigor e motilidade espermática, obtidos a partir das avaliações do sêmen após descongelamento e ressuspensão nos diferentes diluentes a serem testados.

Para a característica vigor espermático, aos cinco minutos de incubação, os melhores resultados ($p < 0,05$) foram obtidos com o diluente BTS acrescido ou não do ácido 3-indol acético (2,2 e 2,1, respectivamente). Comparando-se com os outros diluentes testados, as diferenças foram significativas ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os diluentes com piores resultados ($p > 0,05$). Após uma hora a 39°C, à exceção do diluente água de coco que obteve o menor valor para vigor (1,0) ($p < 0,05$), todos os outros não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$). Em todos os diluentes houve uma queda dos valores do vigor espermático entre os dois momentos de incubação do sêmen (cinco minutos e uma hora) (Figura 1).

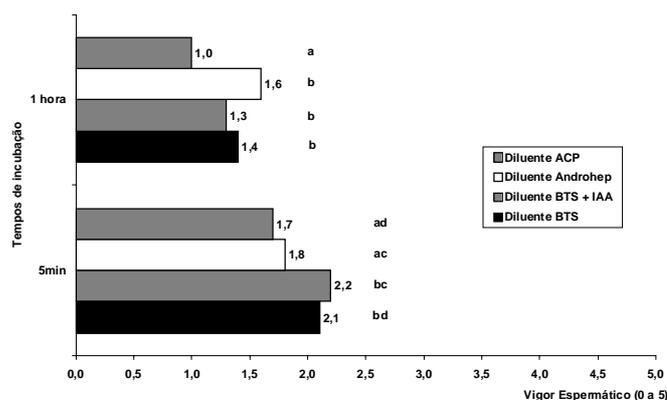


Figura 1: Vigor espermático do sêmen suíno descongelado e ressuspensão em diferentes diluentes, após incubação a 37°C

Analisando-se a motilidade, aos cinco minutos de incubação, verificou-se que quando ressuspenso no diluente BTS obteve-se o melhor resultado (41,9%), apesar de não ter havido diferença dos resultados quando comparado com o diluente IAA (36,5%) ($p>0,05$). Comparando-se com os resultados dos outros dois diluentes testados (ACP = 30,4; ADHP = 32,3%), estes últimos foram mais baixos ($p<0,05$), apesar de não diferirem entre si ($p>0,05$). Após a uma hora de incubação, a semelhança do obtido para o vigor espermático, a motilidade observada no sêmen foi mais baixa no diluente água de coco (9,7%). Foi diferente ($p<0,05$) em relação aos outros diluentes (ADHP = 20,0; IAA = 17,2 e BTS = 18,3%). Os valores da motilidade também caíram em todos os diluentes, durante o período de incubação do sêmen, com o ACP apresentando o pior resultado ($p>0,05$) (Figura 2).

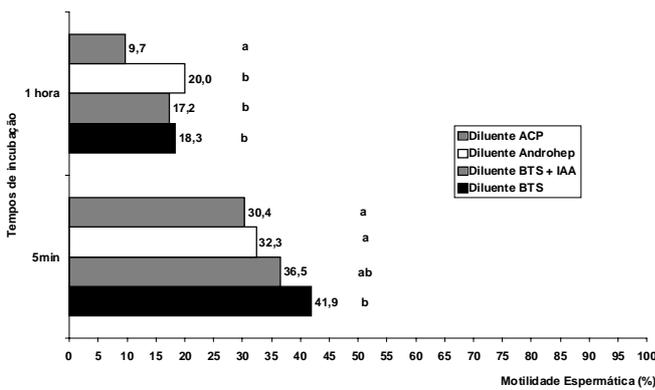


Figura 2: Motilidade espermática do sêmen suíno descongelado e ressuspenso em diferentes diluentes, após incubação a 37°C

Os resultados das análises morfológicas indicaram dois diluentes (ADHP e IAA) que apresentaram os melhores resultados com percentagens de células com acrossoma normal (NAR) de 65,7 e 59,5%, respectivamente. Estes valores foram melhores do que os apresentados nos diluentes BTS (55,8%) e água de coco (58,5%) ($p<0,05$). Analisando-se os espermatozoides em relação às formas patológicas apresentadas nas análises (PAR, SAR, EAR e DAR) apenas para a perda do capuz acrossômico (PAR) os resultados foram relativamente altos, todos acima de 30% de acometimento.

Comparando-se os resultados de PAR entre os diferentes diluentes de ressuspenção, o ADHP apresentou o melhor resultado (30,8%) ($p<0,05$), com pequena variação entre os resultados dos outros diluentes (35,5% no ADHP; 35,5% no IAA e 37,5% para o diluente água de coco. Com relação as outras patologias, os valores encontrados foram muito baixos, sempre inferior a 5%. Ainda assim verificou-se em todos os casos (SAR, EAR e DAR) que o diluente BTS apresentou os maiores valores (3,7; 4,9 e 0,8%, respectivamente) ($p<0,05$) (Figura 3).

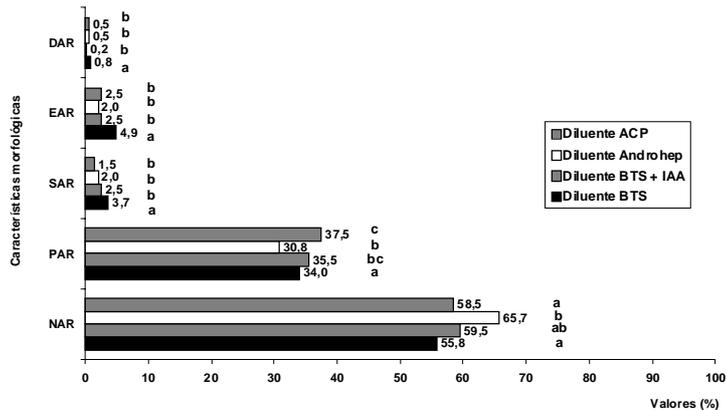


Figura 3: Integridade morfológica do espermatozóide suíno descongelado e ressuspenso em diferentes diluentes, após incubação a 37 °C

Discussão

O desempenho da água de coco (ACP) sobre a preservação das características de motilidade espermática do sêmen suíno apresentou neste trabalho resultados com valores baixos para ambas características estudadas, diferenciando-se dos resultados obtidos por Toniolli et al. (1998) que, utilizando este diluente para a conservar o sêmen do varrão, obtiveram melhores resultados até duas horas de incubação a 39°C. Neste caso, autores citados trabalharam com sêmen resfriado e as diferenças encontradas podem ser explicadas pelo estresse térmico provocado pela técnica de congelação/descongelação do sêmen.

A criobiologia aplicada à conservação de sêmen foi inicialmente utilizada por Polge et al. (1949), que relataram o efeito crioprotetor do glicerol na sobrevivência espermática após congelação de espermatozoides de diferentes espécies animais. No entanto, esta substância tem-se mostrado pouco efetiva na proteção de espermatozóide suíno contra os efeitos nocivos da congelação (Polge, 1956; Wilmut et al., 1973; Polge, 1976; Larsson, 1978) fato este também observado nos resultados deste trabalho.

Relatos de Maxwell e Johnson (1997) utilizando palhetas de 0,5 mL para congelação constataram que a maior parte das alterações da membrana ocorreram durante o resfriamento, sugerindo que os danos da formação de cristais de gelo ou a toxicidade do glicerol seriam menores do que os danos causados pelo resfriamento dos espermatozoides até 5°C.

O ácido 3-indol acético (IAA), é uma auxina que, ao ser adicionada aos diluentes convencionais para o sêmen de diferentes espécies, conferiu aos espermatozoides um incremento na motilidade com um aumento na taxa de fertilidade, além de permitir a conservação do sêmen por maiores períodos de tempo (Toniolli et al., 1995; Nunes et al., 1996). Neste trabalho o IAA não foi adicionado ao diluente durante o processo de abaixamento da temperatura visando a congelação, tendo sido colocado apenas nos diluentes de ressuspenção, após a descongelação do sêmen. Possivelmente, por este motivo, os valores ficaram abaixo dos encontrados por Toniolli (1996), que adicionou esta substância também ao diluente de congelação. Acredita-se, portanto, que para evidenciar-se a ação do IAA sobre a célula espermática, o mesmo já deve ser adicionado ao diluente no início do processo de congelação, bem como no diluente de ressuspenção do sêmen, após descongelação.

Toniolli (1999) obteve resultados com sêmen resfriado utilizando BTS adicionado do IAA, o qual mostrou uma ação protetora sobre a célula espermática, proporcionando a manutenção de um maior número de espermatozoides normais. Neste trabalho o IAA não diferiu do diluente ADHP que apresentou o melhor resultado (65,7%), mostrando que apesar de modos de conservação diferentes (resfriamento e congelamento), o IAA manteve sua ação protetora.

Quanto à congelabilidade espermática, os ejaculados de todos os reprodutores, aos cinco minutos de incubação, foram classificados como congeláveis, de acordo com os valores mínimos estabelecidos por Coster (1978) de 50% de espermatozoides com morfologia acrossomal normal e de 30% de espermatozoides móveis pós-descongelamento, os quais foram obtidos neste trabalho.

Em boa parte dos estudos, independentemente do protocolo de congelamento/descongelamento utilizado, a motilidade foi normalmente inferior a 50% (Hofmo e Almlid, 1991; Almlid e Hofmo, 1996). No que se refere a integridade morfológica, 50 a 60% dos espermatozoides apresentam o acrossoma

intacto, imediatamente após a descongelamento. Os resultados obtidos nesse experimento confirmam essas informações, visto que o melhor resultado obtido na motilidade foi de 41,9% com o diluente BTS e que o valor máximo de células com acrossoma intacto foi de 65,7% com o diluente ADHP.

Dentro desta mesma óptica, os resultados deste trabalho coincidiram com o de Martin Rillo et al. (1994), que afirma que o acrossoma desempenha um papel importante dentro do processo de fecundação.

Conclusões

Os resultados não permitiram a definição de um diluente de ressuspensão eficaz na preservação das características *in vitro* estudadas pela metodologia, o que sugere a necessidade de uma incubação prévia do sêmen nos mesmos diluentes aumentando o tempo de contato dos espermatozoides com estas substâncias a fim de permitir o aparecimento de uma ação positiva dos mesmos sobre a células espermática.

Referências

- ALMLID, T.; HOFMO, P.O. A brief review of frozen semen application under norwegian AI service conditions. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 31, p. 169-173, 1996.
- BWANGA, C.O. Cryopreservation of boar semen, 1: a literature review. *Acta Vet. Scand.* v. 32, p. 431-453, 1991.
- CRABO, B.G.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen spermatozoa. *Acta Veter. Scand.*, v.12, p.125-127, 1971.
- COSTER, G.E. *Tufgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren "in vitro". Untersuchungen zur Verfahrensverbesserung sowie Besamungsergebnisse nach Anwendung unterschiedlicher Inseminationsmedien und Techniken.* 1978. 65 p. Dissertation of Master Science, Hannover. Tierartliche Hochschule, 1978.
- GRAHAN, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKILAUURILA, M.; BOWER, R.E. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen. *A.I. Digest.*, v. 19, n. 2, p. 12-14, 1971.
- HOFMO, P.O.; ALMLID, T. Recent developments in freezing of boar semen with frozen boar semen in work routine. *Reprod. Dom. Anim.*, Suppl. 1, p.111-122, 1991.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWEL, W.M.C. Storage of boar semen. *An. Reprod. Sci.*, v. 62, p. 143-172, 2000.
- LARSSON, K. Deep freezing of boar sêmen. *Criobiology*, v. 15, p. 352-354, 1978.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.* v. 17, p. 74-82, 1976a.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Influence of thawing diluents and of boars. *Acta Vet. Scand.*, v. 17, p. 43-62, 1976b.
- MARTIN RILLO, S.; SAIZ, F.; ALBA, C.; MARIGORTA, P.; SAGÜESA. Influence de la qualité du sperme sur la fertilité en élevage porcin (AIMVP)., 1994.
- MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v. 48, p. 209-219, 1997
- 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. X CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 01, 2001. *Proceeding...*, 2001. p. 253-254.
- NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; OLIVEIRA, L.F.; TEIXEIRA, M.D. Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação *in vitro* do sêmen na espécie caprina. *Ciênc. An.*, v. 2, p. 32-43, 1996.
- OSINOWO, O.; SALAMON, S. Examination of some processing methods for freezing boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 29, p. 325-333, 1976.
- 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.
- POLGE, C.; SALAMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical inseminations. *Vet. Rec.*, v. 87, p. 424-428, 1970.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v. 164, p. 666, 1949.
- POLGE, C. Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.*, v. 68, p. 62-66, 1956.
- POLGE, C. The fertilizing capacity of boar spermatozoa following freezing and thawing. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., 1976. *Proceeding...*, 1976.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Fertility with frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, v. 33, n. 267, p. 265 (abstract), 1971.
- SALAMON, S.; WILMUT, T.; POLGE, C. Deep freezing of boar semen I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. *Austr. J. Biol. Sci.*, v. 26, p. 219-30, 1973.
- SCHEID, I.R. *Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren, Hanover, Tierärztliche Hochschule*, 1980. 98 p. Tese de Doutorado, Hannover, Alemanha, 1980.
- SCHEID, I.R.; Silveira, P.R.S.; Meinke, W.; Freitas, A.R. *Eficiência a campo do sêmen suíno congelado*, Comunicado Técnico EMBRAPA-CNPSA, v. 46.; p.1-3, 1982.
- SCHEID, I.R.; FAZANO, F.; WENTZ, K.F.; RATH, D. *Minipalletes: uma alternativa para o congelamento de sêmen suíno*, Comunicado Técnico EMBRAPA-CNPSA, n. 106, p. 1-3, 1986.
- TONIOLLI, R. *Pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat : amélioration des conditions de conservation.* Tours-France, 1996. 91 p. Tese de Doutorado, Nouzilly, France, 1996.

TONIOLLI, R.; BARITEAU, F.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y. Conservation prologée du sperme frais de verrat. *Journ. Rech. Porc. en France*, v. 27, p. 67-70, 1995.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.; CAVALCANTE, S.G. Avaliação *in vitro* do sêmen de suíno diluído em BTS e na água de coco *in natura* e estabilizada. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 22, n. 4, p. 198-201, 1998.

TONIOLLI, R., Morfologia dos espermatozoides de suínos, diluídos no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do Ácido-3-indol acético. *Rev. Ciênc. Anim.*, v. 9, p. 61-65, 1999.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala*, p. 113-127, 1981.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert. and Develop.*, p. 871-891, 1995.

WILMUT, I.; POLGE, C. The freezing of boar spermatozoa. VII INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, p.1615, 1972. Munique. *Proceeding...*, 1972.