

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE

CAMPUS CONCÓRDIA

MEDICINA VETERINÁRIA

VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

LUCIO PEREIRA RAUBER

(Professor do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC. Email: lucio.rauber@ifc-concordia.edu.br)

LUCAS COMUNELLO

(Acadêmico do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC. Email: lucas_comunello@hotmail.com)

MARCOS HENRIQUE BARRETA

(Professor do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC. Email: marcos.barreta@ifc-concordia.edu.br)

JULIANO CESAR DIAS

(Professor do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC. Email: juliano.dias@ifc-concordia.edu.br)

VITRIFICACAO DE SÊMEN SUINO

Lucas Comunello¹, Marcos Henrique Barreta², Juliano Cesar Dias², Lucio Pereira Rauber³

RESUMO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de suínos do país e o oeste catarinense se destaca por sua produtividade. No estado, a inseminação artificial em suínos é bastante difundida, sendo utilizado o sêmen fresco, pois há dificuldade em se congelar o sêmen suíno devido a particularidades na membrana celular espermática. Para contornar este problema vários protocolos de congelamento e uso de diferentes crioprotetores são propostos, mas sem sucesso significativo até o momento. O objetivo deste projeto é a utilização de uma tecnologia chamada vitrificação para criopreservar o gameta masculino procurando causar o menor dano possível às estruturas celulares. Os experimentos ocorrerão no Instituto Federal Catarinense-Campus Concórdia e na EMBRAPA Suínos e Aves, também em Concórdia. O sêmen será coletado pelo método de mão enluvada de reprodutores mantidos em baias individuais, com dieta controlada. Após a coleta serão feitas avaliações do ejaculado quanto à motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Feitas as avaliações será iniciado o processo de criopreservação convencional (grupo controle) e por vitrificação (tratamento). No descongelamento também serão aplicados exames de viabilidade espermática, como motilidade e vigor e posteriormente as doses serão encaminhadas para análise da integridade da membrana com utilização de sondas fluorescentes específicas. Este projeto permitirá estabelecer uma linha de pesquisa em criopreservação de espermatozoides suínos e inseminação artificial com sêmen congelado, que servirá de base para projetos futuros envolvendo outras biotecnologias como a *produção in vitro* (PIV) de embriões suínos, possibilitando um melhor aproveitamento do material genético, formação de bancos de germoplasma.

Palavras-chave: Criopreservação, biotecnologias, vitrificação, inseminação artificial.

1 INTRODUÇÃO:

A maioria das inseminações artificiais (IA) em suínos realizadas no mundo utiliza sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C, por um período de 1 (um) a 5 (cinco) dias, sendo que 85% destas são realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte (JOHNSON et al., 2000). Entretanto, a temperatura de estocagem de 15 a 18°C limita o transporte do sêmen, pois exige caixas térmicas específicas para esta faixa de temperatura, além de restringir o tempo de vida útil do sêmen. Ainda que a utilização da IA em suínos esteja aumentando, sua expansão poderia ser

¹Aluno do Instituto Federal Catarinense, Concórdia: lucas_comunello@hotmail.com

²Professor do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, Co-orientador

³Professor do Instituto Federal Catarinense, Concórdia, Orientador: lucio.rauber@ifc-concordia.edu.br

incrementada se técnicas como a criopreservação (congelamento) do sêmen possibilitassem adequados resultados de fertilidade, tal como ocorre na espécie bovina (DESCHAMPS et al., 1997; WATSON, 2000).

O sêmen suíno congelado esta disponível comercialmente desde 1975. Entretanto, o seu uso tem ocorrido somente em ocasiões específicas, como em casos de importação de genética, visando a produção de reprodutores (JOHNSON e LARSSON, 1985). O sêmen suíno congelado resulta em menor taxa de concepção e em menor número de leitegada na inseminação artificial, quando comparado com o sêmen fresco. Além disso, a diminuição na qualidade das células espermáticas, provocadas pelo congelamento, implica no uso de uma dose inseminante maior (BIANCHI et al., 2008). Isto se deve a uma maior sensibilidade do espermatozoide suíno ao congelamento. Os parâmetros de qualidade espermática comumente analisados, como motilidade, já se alteram durante o resfriamento do sêmen (CREMADES et al., 2005) e caem bastante após o processo de congelamento e descongelamento (CEROLINI et al., 2001; MEDRANO et al., 2002).

Diversos trabalhos tem demonstrado que existem diferenças na dupla camada lipídica da membrana do espermatozoide suíno que podem explicar sua maior susceptibilidade ao choque pelo resfriamento (WATSON, 1995; BUHR e PETTIT, 1996). Estas diferenças estruturais ajudam a explicar a alta sensibilidade do espermatozoide suíno ao choque pelo frio, o que provoca um aumento da permeabilidade da membrana e conseqüente perda de cátions e enzimas através da mesma, redução da atividade enzimática e dos processos de difusão controlados pela membrana (JOHNSON et al., 2000).

A faixa crítica de temperatura durante o processo de resfriamento varia de +15 a 5° C a qual, geralmente culmina com a solidificação dos lipídios de membrana dos gametas ocasionando danos irreversíveis a membrana plasmática da célula. Os sistemas convencionais de criopreservação de sêmen suíno preveem curvas lentas de resfriamento (em torno de 4 a 30°C/min) o que implica em uma queda significativa da viabilidade espermática antes do processo de congelamento (CREMADES et al., 2005).

O objetivo deste projeto é desenvolver uma tecnologia de criopreservação que proporcione taxas rápidas de resfriamento e avaliar se o

aumento da velocidade de resfriamento pode melhorar a viabilidade espermática pós-descongelamento.

2 METODOLOGIA:

Coleta do sêmen:

Como doadores de sêmen, serão utilizados cachorros de fertilidade comprovada em regime de coleta. Os animais serão mantidos em baias individuais com dieta controlada e água *ad libitum*. A coleta será realizada pelo método da mão enluvada, descartando-se a fração rica em gel do ejaculado. Só serão processados os ejaculados com motilidade espermática acima de 80%.

Avaliação do sêmen:

Para avaliação do ejaculado, serão considerados a motilidade, o vigor e a concentração espermáticas. A motilidade e o vigor serão avaliados em microscopia óptica com aumento de 40 vezes. A motilidade será expressa em percentual de células moveis da amostra (0 a 100). Para o vigor, serão atribuídos valores de 1 a 5 pontos, de modo que os valores mais elevados indicam os espermatozoides mais vigorosos. A concentração espermática será obtida com auxílio de um aparelho de espectrofotômetro e será aferida uma contraprova por contagem direta de espermatozoides utilizando a câmara de Neubauer.

Avaliação da viabilidade espermática:

Primeiro será realizada a avaliação da morfologia espermática sob microscopia de contraste de fase, de acordo com as normas da sociedade brasileira de reprodução animal, e para a avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e o potencial mitocondrial, serão utilizadas sondas fluorescentes. Estas avaliações serão realizadas após o congelamento do sêmen, na EMBRAPA Suínos e Aves.

Criopreservação:

Cada ejaculado será fracionado em partes iguais e cada uma diluída na proporção de 1:1 utilizando o diluente comercial BTS (Minitube do Brasil). O sêmen será resfriado até atingir 15°C, sendo centrifugado a 800 x g por 10min para a retirada do plasma seminal. O sedimento será ressuspense em diluente mantendo a concentração final de 3×10^9 /mL. Para realizar o congelamento, o sêmen será refrigerado até 5°C em 90min e acrescido do diluente com crioprotetores para congelamento, de acordo com o tratamento. Após o resfriamento e diluição, o sêmen será envazado em palhetas de 0,5mL. O sêmen vitrificado será centrifugado da mesma forma, mas antes do resfriamento.

Grupo Controle (congelamento tradicional):

Para o congelamento convencional o precipitado será diluído em solução salina com 20% (vol/vol) de gema de ovo e 9% (vol/vol) de Glicerol. A curva de congelamento será de 4°C por minuto de 5°C até 100 °C, e de 20°C de 100 °C até 196 °C. As palhetas serão alocadas na horizontal, a 5 (cinco) cm da superfície de nitrogênio líquido (N2L) por 20min e mergulhadas em N2L após esse período. Após o congelamento as doses ficarão armazenadas em botijões de N2L até o momento das avaliações e/ou inseminações.

Vitrificação:

O precipitado utilizado para vitrificação será diluído em solução salina fosfatada (PBS) contendo trealose (100mM), Dglucose (5.5mM), piruvato de sódio (12.2mM), glicina (133mM), HEPES (20mM), glicerol 10% (vol/vol) e albumina sérica suína 10% (peso/vol). Os espermatozoides serão mantidos na solução crioprotetora por 5 (cinco) minutos em temperatura ambiente antes de serem submersos diretamente em N2L (196°C).

Descongelamento:

O descongelamento das doses será efetuado a 37°C por 20 segundos e ressuspense em 10mL de meio BTS em banho-maria a 37°C. As doses, após o descongelamento, serão avaliadas quanto a motilidade, o vigor e a viabilidade espermática.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Inicialmente, espera-se estabelecer uma nova técnica simples, barata e eficiente de criopreservação de gameta masculino de suínos. Especificamente, este projeto permitirá estabelecer uma linha de pesquisa em criopreservação de espermatozoides suínos e inseminação artificial, que servirá de base para projetos futuros envolvendo outras biotecnologias como a PIV.

4. REFERÊNCIAS

- BIANCHI, I., CALDERAM, K., MASCHIO, E.F., MADEIRA, E.M., ULGUIM, R.R., RAMBO, G., CORREA, E.K., LUCIA JUNIOR, T., DESCHAMPS, J.C., CORREA, M.N. **Inseminação artificial intrauterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol.** *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.1978-1983, 2008.
- BUHR, M.M.; PETTIT, M.J. **Frozenthawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement.** *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, p.147-152, 1996.
- CEROLINI, S., MALDJIAN, A., PIZZI, F., GLIOZZI T.M. **Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen.** *Reprod.* v.121, p.395-401, 2001.
- CREMADES, T., ROCA, J., RODRIGUEZ MARTINEZ, H., ABAIGAR T., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A. **Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa.** *J Androl*, v.26, p.610-618, 2005.
- DE ANDRADE, A.F., DE ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C., NASCIMENTO, J., MARTINS, S.M., RAPHAEL, C.F., MORETTI, A.S. **Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm.** *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, p.190-194, 2007.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. **Storage of boar semen.** *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.143-172, 2000.
- MEDRANO, A., WATSON, P.F., HOLT, W.V. **Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope.** *Reprod.* v.123, p.315-322, 2002.
- WATSON, P.F. **Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity.** In: *International Conference on Boar Semen Preservation*, 3, 1995, Mariensee. *Anais...Mariensee, IBSP*, 1995. p.135-140.