



ESTUDO DA DIMETILACETAMIDA E ETILENOGLICOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

Autores: Kebb Klobukoski BORSTNEZ¹; Monike QUIRINO²; Mariah SCHUCH³; Arnaldo VIEIRA⁴; Rafael MONDADORI⁴; Thomaz LÚCIA JUNIOR⁴; Fabiana MOREIRA⁵; Ivan BIANCHI⁶.

Identificação autores: ¹ Bolsista PIBITI/CNPq; ² Mestranda, UFRGS – Porto Alegre; ³ Médica Veterinária Autônoma; ⁴ Professor, UFPEL – Pelotas; ⁵ Professor, IFC – Campus Araquari; ⁶ Orientador, IFC- Campus Araquari.

RESUMO

O uso de crioprotetores alternativos para sêmen suíno vem sendo estudado na tentativa de melhorar os resultados dessa biotécnica e ampliar sua utilização em plantéis suínos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da utilização dos crioprotetores dimetilacetamida e etilenoglicol na criopreservação do sêmen suíno. Foram realizadas análises de motilidade e vigor, integridade de membrana, avaliação mitocondrial e integridade de acrossoma (0, 2, 4, 6h pós descongelamento). O etilenoglicol 1,25% demonstrou melhor conservação da motilidade, denotando a eficiência dessa substância na criopreservação de sêmen suíno ao manter a viabilidade espermática superior ao longo de 6 horas pós-descongelamento.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Inseminação Artificial (IA) é uma das alternativas que vem sendo utilizada em, praticamente 100% das unidades industriais de produção de suínos. Contribuindo para um melhor aproveitamento do ejaculado, diminuindo os custos e garantindo benefícios para o melhoramento genético (DE LEEUW *et al.*, 1991). O congelamento de sêmen é uma biotécnica reprodutiva de grande importância para aumentar a eficiência dos rebanhos, pois, através da IA com amostras armazenadas sob congelamento, é possível realizar o cruzamento de animais geneticamente superiores, mesmo estando distantes (GERRITS *et al.*, 2005). Porém, o congelamento de sêmen suíno ocasiona uma queda de 20 a 30% nas taxas de parição e diminuição de dois a três leitões por leitegada, tornando a técnica pouquíssimo utilizada (DE LEEUW *et al.*, 1991).

Estudos para viabilizar o congelamento do sêmen suíno têm sido realizados a partir do uso de soluções crioprotetoras em associação ou substituição ao glicerol. O princípio da técnica de congelamento consiste na diminuição do metabolismo e na desidratação da célula através do uso de crioprotetores intracelulares (baixo peso molecular) e extracelulares (alto peso molecular) (DE LEEUW *et al.*, 1991).



Crioprotetores alternativos têm sido estudados na tentativa de melhorar seus resultados e ampliar sua utilização em plantéis suínos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da utilização dos crioprotetores dimetilacetamida e etilenoglicol em diferentes concentrações na criopreservação do sêmen suíno, através da determinação de parâmetros *in vitro* da viabilidade espermática.

METODOLOGIA

Foram utilizados dois reprodutores suínos (Landrace x Large White), de fertilidade conhecida. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo. Foram realizadas 10 coletas de cada macho pelo método da mão enluvada. Em cada coleta, foram obtidas alíquotas de 10 ml da fração rica em espermatozoides (SPTZ), sendo diluídas (1:1, v/v) em tubo cônico, de 50 ml, no diluidor de resfriamento (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 0,8%, v/v, Orvus Ex Paste, Equex-Paste; 20%, v/v, gema de ovo). Somente ejaculados com motilidade espermática mínima de 80% foram utilizados. Após determinação da concentração, os ejaculados foram misturados em condições isotérmicas a fim de obter um *pool* com a mesma quantidade de SPTZ de cada reprodutor.

Ao diluidor de resfriamento, foi adicionado glicerol (GLI) e etilenoglicol (EG) a 2,5% e 1,25%, bem como dimetilacetamida (DMA) a 5,0% e 2,5%, totalizando seis tratamentos: GLI 2,5%; GLI 1,25%; EG 2,5%; EG 1,25%; DMA 2,5% e DMA 5,0%. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 ml, com 35×10^6 SPTZ móveis/palhetas. Na sequência, foi realizada a estabilização durante 90 min a 20°C, seguida da curva de resfriamento até 5°C à taxa de 0,3-0,5°C/min, permanecendo por 60 min. O congelamento das palhetas foi de forma horizontal, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 10 min, e o armazenamento foi feito em nitrogênio líquido. As doses foram descongeladas a 37°C por 30 s.

As análises de qualidade espermática pós-descongelamento foram: motilidade e vigor, através de microscopia óptica (0, 2, 4 e 6 h após o descongelamento); integridade de membrana, avaliação mitocondrial e integridade de acrossoma, por meio de sondas fluorescentes em microscopia de fluorescência (0, 3 e 6 h após o descongelamento). A avaliação da motilidade espermática pós-

descongelamento também foi realizada no sistema automatizado *Computer-assisted semen analysis* (CASA) Sperm Vision® 3.5 (Minitüb GmbH Tiefenbach, Germany).

As avaliações do nível de apoptose, funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e acrossomal foram realizadas em citometria de fluxo no equipamento Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, USA), avaliando-se 10.000 células por tratamento e por repetição.

A análise estatística descritiva dos dados e posterior teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para as variáveis dependentes paramétricas foi feita a análise de variância, testando as possíveis interações e comparação de médias através do teste Tukey. Para os dados não paramétricos, realizou-se análise de Kruskal-Wallis e comparação de médias. Para todas as análises estatísticas, diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas. Todas as análises foram executadas utilizando o programa Statistix 10® (STATISTIX, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores médios e erro padrão do pH, bem como da osmolaridade de acordo com cada crioprotetor em diferentes concentrações, estão demonstrados na tabela 1. Os valores de pH se encontram dentro do fisiológico para a espécie (BIANCHI *et al.*, 2006). A motilidade em 0 h, com diferentes crioprotetores em concentrações distintas (tabela 2) não apresentou diferença estatística ($P > 0,1031$). Após 4 h do descongelamento, a motilidade do tratamento com DMA 5,0% foi semelhante aos demais crioprotetores, com exceção do EG 1,25%, que demonstrou a melhor motilidade entre todos os crioprotetores ($P < 0,05$).

O crioprotetor EG 1,25% apresentou o melhor desempenho entre os demais crioprotetores ao longo de 6 h de avaliação ($P < 0,05$). A integridade de membrana, mitocondrial e de acromossoma não diferiram, independentemente dos tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 1: Média e erro padrão do pH e da osmolaridade do sêmen suíno descongelado, utilizando três crioprotetores em diferentes concentrações.

Tratamentos	n	pH	Osmolaridade
DMA 2,5%	5	6,6±0,03	955,57±123,8
DMA 5,0%	5	6,6±0,03	1464,2±37,3
EG 1,25%	5	6,4±0,07	826,2±76,7
EG 2,5%	5	6,6±0,04	1396,7±178,2
GLI 1,25%	5	6,5±0,04	638,8±43,5
GLI 2,5%	5	6,5±0,02	1004,0±102,6

DMA: dimetilacetamida (DMA); EG: Etilenoglicol; GLI: Glicerol.

DMA, EG e GLI têm um caráter de hiperosmolaridade, reduzindo o ponto de congelamento para -5 a -7°C . A osmolaridade hiperosmótica do diluidor de congelamento tem o objetivo de retirada de água da célula (GERRITS *et al.*, 2005).

Tabela 2: Média e erro padrão da motilidade espermática ao longo de 6 h após descongelamento, utilizando diferentes crioprotetores em concentrações distintas.

Tratamento	n	Motilidade (média ± erro padrão)			
		0h	2h	4h	6h
DMA 2,5%	10	50,0±3,9	27,0±3,7 ^a	12,0±3,3 ^{ab}	1,0±0 ^{bc}
DMA 5,0%	10	40,0±5,2	8,0±3,9 ^b	1,0±1,0 ^b	0,0±0,0 ^c
EG 1,25%	10	48,0±3,6	37,0±3,7 ^a	22,0±4,7 ^a	10,0±2,1 ^a
EG 2,5%	10	35,0±4,0	30,0±3,6 ^a	14,0±3,4 ^{ab}	8,0±2,0 ^{ab}
GLI 1,25%	10	48,0±4,7	34,0±4,3 ^a	13,0±4,2 ^{ab}	3,0±2,1 ^{abc}
GLI 2,5%	10	41,0±3,8	24,0±5,2 ^{ab}	9,0±3,1 ^{ab}	0,0±0,0 ^c

DMA: dimetilacetamida (DMA); EG: Etilenoglicol; GLI: Glicerol.

Dessa forma, interagem e estabilizam as membranas celulares e atuam como tampão salino no combate aos efeitos deletérios das altas concentrações de eletrólitos nas células desidratadas (DE LEEUW *et al.*, 1991). O uso do etilenoglicol demonstrou a eficiência dessa substância na criopreservação de sêmen suíno ao manter a viabilidade espermática, tornando seu uso viável para a conservação de



sêmen suíno sob baixas temperaturas. Estudos acerca do congelamento de sêmen na suinocultura, representam avanços nas biotécnicas de reprodução amplamente difundidas na cadeia de produção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do etilenoglicol na concentração de 1,25% apresentou os melhores resultados na motilidade espermática, dentre todos os crioprotetores, até 6 h após o descongelamento.

REFERÊNCIAS

AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais do congresso** Concórdia: Embrapa, 2006b, CD-ROM.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; et al. Congelamento de sêmen suíno usando amidas em diferentes concentrações. *In: CONGRESSO LATINO-*

DE LEEUW, F.E., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**. *Suppl.* 1, 95-104, 1991.

ERIKSSON, B.M. Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. **Theriogenology**, 58, 1065–1079, 2002.

GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; et al. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**. 63, 283-299, 2005.

STATISTIX®. Statistix 10 Analytical Software. Tallahassee. FL, USA. 2013.

