

FERTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO PRESERVADO A 5°C EM DILUENTE CONTENDO TREALOSE

GONSALES, J.A.C.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T. Jr.; MACHADO, A.C.; RECH, D.C.

UFPel- Centro de Biotecnologia – 96010 -900 – Pelotas - RS e-mail: vaqueano@ufpel.tche.br - Tel: (0532) 75-7350
(Recebido para publicação em 13/09/1999)

RESUMO

A utilização de inseminação artificial (IA) em suínos tem crescido de forma marcante no Brasil. Porém, a dificuldade de manutenção do sêmen por longo tempo em temperaturas adequadas representa uma limitação para a expansão de programas de IA. Portanto, a possibilidade de acondicionar o sêmen a 5°C, seria uma importante alternativa para viabilizar a preservação do sêmen suíno por períodos mais longos. Este estudo teve como objetivo determinar as características de qualidade (motilidade espermática, integridade dos acrossomas e taxa de fertilização) de sêmen suíno diluído no meio Beltsville Thawing Solution (BTS), mantido à 5°C, com adição de trealose ao diluidor BTS. Os efeitos dos diluentes BTS e BTS+T (BTS contendo 0,2% de trealose) e dos dias entre a coleta do sêmen e a IA, sobre as características de qualidade do sêmen foram analisados por análise de variância, seguindo um arranjo fatorial 2 x 2, totalizando quatro tratamentos. Oitenta fêmeas nulíparas, foram inseminadas artificialmente e sacrificadas dois à cinco dias após a IA. Tanto a motilidade espermática como a integridade de acrossomas não diferiram em função do diluente ($P > 0,05$), mas ambas as variáveis diferiram em função do dia da IA ($P < 0,01$). Com relação ao número de dias após a inseminação, a taxa de fertilização no dia 1 foi de 72,9% para o diluente BTS e de 65,7% para o diluente BTS+T. No dia cinco, a taxa de fertilização para os diluentes BTS e BTS+T totalizou 74,9% e 71,2% respectivamente. Em ambos as situações, a taxa de fertilização não diferiu ($P > 0,05$) em função do número de dias após a inseminação. Os resultados obtidos indicam que a adição de trealose ao diluente BTS não trouxe benefício para a qualidade do sêmen suíno armazenado a 5°C.

Palavras-chave: Inseminação artificial; sêmen; suíno; trealose.

ABSTRACT

FERTILITY OF THE SWINE SEMEN STORED AT 5°C IN TREHALOSE ADDED EXTENDER. The use of artificial insemination (AI) in swine is remarkably increasing in Brazil. However, the difficulties concerning to long-term semen maintenance at adequate temperatures represent a limitation for the expansion of AI programs. Thus, the possibility of storing semen at 5°C would be an important alternative to make the preservation of swine semen feasible during long time periods. This study had the objective of determining whether sperm motility, acrosome integrity and fertilization rate of swine semen extended in the Beltsville Thawing Solution (BTS) and stored at 5°C would be improved by the addition of trehalose to the BTS extender. The effects of the extenders BTS and BTS+T (BTS plus 0.2% trehalose) and of the number of days between semen collection and AI (1 or 5) on characteristics of semen quality were estimated through an analysis of variance following a 2 x 2 factorial design (4 treatments). Eighty parity-zero females (20 per treatment) were artificially inseminated and slaughtered 2 to 5 days after the AI. Both sperm motility and acrosome integrity differed as a function of the day of AI ($P < 0,01$), but neither one differed for distinct extenders ($P > 0,05$). Fertilization rate at day 1 was 72.9% for BTS and 65.7% for BTS+T, whereas fertilization rate at day 5 was 74.9% for BTS and 71.2% for BTS+T (both $P > 0,05$). Therefore, these results indicate that addition of trehalose to the BTS extender did not benefit the quality of swine semen stored at 5°C.

Key words: Artificial insemination; semen; swine; trehalose.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) em suínos têm expandido de forma marcante, em especial devido à obtenção de índices de desempenho similares aos obtidos com monta natural. Além de representar uma barreira adicional contra a introdução de doenças infecciosas a nível de granja, a IA é uma alternativa para maximizar o melhoramento de características maternas e de qualidade de carcaça, acelerando os benefícios econômicos. Adicionalmente, a implementação de IA permite a redução de machos no plantel e a conseqüente expansão do inventário de fêmeas em reprodução, o que se reflete na produção de um maior número de leitões desmamados por unidade de tempo, redução nos custos fixos e maior eficiência no uso das instalações (DESCHAMPS et al., 1998).

A IA em suínos geralmente é praticada com sêmen resfriado e mantido entre 15 e 18°C (ALTHOUSE et al., 1998). A dificuldade de manutenção de tais temperaturas de armazenamento pode restringir a utilização do sêmen resfriado, principalmente em regiões onde predominam temperaturas elevadas (BORTOLOZZO & WENTZ 1997). Assim, a possibilidade de estocar sêmen a 5°C, em refrigeradores comuns, amplia a aplicabilidade da IA, propiciando considerável redução de custos, tanto para granjas que produzam sêmen internamente, como para aquelas que venham a adquirir sêmen de outras fontes externas.

A trealose é um dissacarídeo cuja função é dar estabilidade à membrana plasmática (LEE et al., 1986), além de reduzir o efeito negativo do choque térmico sobre os espermatozoides submetidos a congelamento (DROBNES et al., 1989). A adição de trealose a diluentes para resfriamento de sêmen suíno tem aumentado a viabilidade do sêmen por até 6 dias (REVELL & GLOSSOP, 1989).

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da adição de trealose ao diluente BTS, sobre a motilidade espermática, a integridade de acrossomas e a taxa de fertilização de sêmen suíno mantido à 5°C.

MATERIAL E MÉTODOS

O sêmen utilizado neste experimento foi coletado de um macho da raça Landrace, com um ano de idade e com fertilidade comprovada. Foram realizadas 4 coletas. As coletas de sêmen foram executadas pelo método da mão enluvada. O sêmen foi acondicionado em frascos de vidro pré-aquecidos, cobertos com uma camada de gaze esterilizada, a fim de filtrar a fração rica do ejaculado. As porções inicial e gelatinosa do ejaculado foram desprezadas. Após a coleta, o sêmen foi colocado em banho-maria a 37°C. O volume foi medido no

próprio frasco de coleta. Os exames microscópicos foram realizados imediatamente após a coleta. A avaliação da taxa de motilidade espermática foi efetuada pela observação, em aumento de 200 vezes, de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida. A concentração espermática foi feita a partir da diluição de uma amostra de 0,02mL de sêmen em 2mL de solução formol salina tamponada, com posterior contagem de células em uma câmara de Neubauer. Uma amostra de sêmen foi coletada para avaliação da integridade do acrossoma. Após essa avaliação, o sêmen foi mantido em banho-maria, e posteriormente diluído, na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluidor Beltsville Thawing Solution - BTS (PURSEL & JOHNSON, 1975). Na diluição, utilizaram-se dois tratamentos: BTS e BTS acrescido 0,2% de trealose (BTS+T). O sêmen diluído foi resfriado à 5°C. O sêmen resfriado foi agitado levemente duas vezes ao dia, para homogeneizar a porção sedimentada no fundo do recipiente. Antes de sua utilização na IA (um ou cinco dias após a coleta), o sêmen foi retirado do refrigerador e aquecido em banho-maria a 37°C por 20 minutos. A motilidade espermática foi avaliada novamente e outra amostra de sêmen foi retirada para avaliação da integridade do acrossoma pós-diluição. Após esses procedimentos, o sêmen foi novamente diluído em vinte doses de 80 mL, contendo 2×10^9 espermatozoides por dose. Dez dessas doses foram acrescidas com BTS e as outras dez foram acrescidas de BTS+T.

Foram utilizadas 80 fêmeas pré-púberes, com peso médio de 85,5Kg (variação entre 70 e 90Kg). As fêmeas tiveram cio sincronizado e ovulação induzida através dos hormônios: Gonadotrofina Coriônica Equina (PMSG-CAL, Cientistas Associados Produtos Biológicos Ltda. Pelotas-RS) e Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG/Vetecor- Sero no Produtos Farmacêuticos Ltda. São Paulo-SP). O tratamento hormonal foi realizado via intramuscular de 500 UI de PMSG + 250 UI de hCG, seguida de 500 UI de hCG., 72 horas após.

O estudo seguiu um delineamento fatorial 2x2, representando diferentes combinações de diluições (BTS e BTS + T) e de número de dias entre a coleta do sêmen e a inseminação (dia um ou dia cinco). Portanto, a combinação dos fatores mencionados resultou em quatro tratamentos. As oitenta fêmeas foram divididas em quatro grupos: dez fêmeas de cada grupo foram inseminadas um dia após a coleta (D1) e dez fêmeas foram inseminadas cinco dias após a coleta (D5). No grupo D1, cinco fêmeas foram inseminadas com sêmen diluído em BTS e outras cinco fêmeas foram inseminadas com sêmen diluído em BTS+T. No grupo D5, foi seguido o mesmo procedimento. A IA foi realizada intracervicalmente, utilizando pipetas do tipo *Melrose*, trinta e duas horas após a aplicação isolada do hCG (CORRÊA, 1998).

Entre dois e cinco dias após a IA, todas as leitoas foram sacrificadas, sendo seus sistemas genitais coletados no frigorífico e transportados para o laboratório. A ocorrência de ovulação foi determinada pelo número de corpos lúteos (CL) existentes no ovário. Foi realizada a lavagem do oviduto e cornos uterinos (em torno de 20cm da junção útero-tubárica), com solução salina para a coleta das embriões e ovócitos, para posterior avaliação da taxa de fertilização. Células que tivessem sofrido processo de divisão e contivessem dois ou mais blastômeros foram classificadas como embriões, enquanto as célula sem divisão (não fertilizadas) foram classificadas como ovócitos. A taxa de fertilização foi calculada pela divisão do número de embriões recuperados

pelo número total de estruturas recuperadas (embriões + ovócitos), multiplicado por 100. A taxa de recuperação obteve-se pela soma do número de embriões e de ovócitos recuperados, dividido pelo número de CL e multiplicado por 100.

Análise de variância foi utilizada para avaliar o efeito dos tratamentos (diluente e dias entre coleta e inseminação) sobre as características de motilidade, acrossomas normais e taxa de fertilização através dos procedimentos GLM do SAS® (1990). A análise seguiu o seguinte modelo estatístico: $Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + D_iT_i + e_{ijk}$, onde Y_{ijk} representa o valor observado da variável resposta (motilidade, acrossomas normais e taxa de fertilização); μ é a média geral; D_i representa o efeito esperado do dia da IA; T_j representa o efeito esperado do diluente; D_iT_i representa o efeito esperado da interação entre dia e diluente; e e_{ijk} representa o componente casual de erro atribuído à cada observação.

RESULTADOS

As características de qualidade da fração rica em espermatozoides do ejaculado, observadas logo após a coleta são descritas na TAB. 1.

TABELA 1. Volume, motilidade, proporção de acrossomas normais e concentração espermática após a coleta do sêmen

Coleta	Volume (ml)	Motilidade (%)	Acrossomas (%)	Concentração ($\times 10^6/\text{mm}^3$)
1	90	90,0	93,0	0,42
2	120	90,0	89,5	0,40
3	130	85,0	92,0	0,36
4	150	90,0	95,5	0,38

O efeito dos diluentes sobre a motilidade e a proporção de acrossomas normais nos D1 e D5 estão descritos na TAB. 2. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) em motilidade e na proporção de acrossomas normais em função do diluente. Entretanto, ambas as variáveis sofreram uma redução ($P < 0,01$) no D5 em comparação com o D1.

O número de total de CL foi de 1.640, com a média de 20,5 CL por fêmea. O número de estruturas recuperadas (embriões + ovócitos) foi de 874, com uma média de 10,9 por fêmea, obtendo-se uma taxa de recuperação de 54,1%. O número total de embriões foi de 619 e o número de ovócitos foi de 255, com uma taxa de fertilização geral de 71,2%.

O número médio de estruturas fertilizadas e a taxa de fertilização não diferiram ($P > 0,05$) em função do diluente e do dia da IA (TAB. 3). Porém, apesar de não terem sido observadas diferenças entre os dois tratamentos, o uso da trealose foi associado com uma média de embriões por leitoa numericamente maior do que a obtida apenas com BTS (8,6 e 6,8, respectivamente). Essa diferença pode se refletir em incrementos no tamanho de leitegada. O fato de que a taxa de fertilização não acompanhou esta tendência provavelmente está relacionado com o maior número de ovócitos (estruturas não fertilizadas) obtidos com o tratamento BTS+T, o que reduziu a taxa de fertilização.

TABELA 2. Efeito dos tratamentos (BTS e BTS+T)* e do dia da IA (D1 e D5)** sobre a motilidade espermática e integridade dos acrossomas

Coleta	Motilidade (%)				Acrossomas Normais (%)			
	BTS		BTS+T		BTS		BTS+T	
	D1	D5	D1	D5	D1	D5	D1	D5
1	70,0	50,0	60,0	50,0	57,5	35,5	65,0	32,0
2	60,0	30,0	70,0	40,0	71,0	37,0	82,5	38,0
3	50,0	30,0	50,0	30,0	65,5	42,0	75,5	37,0
4	60,0	30,0	70,0	30,0	80,0	35,5	67,0	32,0
Média	60,0	35,0	62,5	37,5	68,5	37,2	72,2	34,7

*Comparações entre tratamentos não diferem estatisticamente ($P > 0,05$), na mesma linha.

**Comparações em função do dia da IA diferem por pelo menos $P < 0,01$, na mesma linha.

TABELA 3. Número médio de embriões (NE) e taxa de fertilização (TF) por fêmea, em função do tratamento e do dia da inseminação artificial

Diluente	N	Dia 1		Dia 5		Total	
		NE	TF (%)	NE	TF (%)	NE	TF (%)
BTS	40	5,6	72,9	8,0	74,9	6,8	73,9
BTS+T	40	8,3	65,7	8,9	71,2	8,6	68,4
Total	80	7,0	69,3	8,5	73,0	7,7	71,2

Médias não diferem estatisticamente ($P > 0,05$)

O número médio de ovócitos obtido com o diluente BTS foi igual a 2,4 não diferiu ($P > 0,05$) da média obtida com o diluente BTS + T (3,9). O número médio de ovócitos obtidos tanto em D1 como em D5 foi de 3,1 ($P > 0,05$). O uso de BTS no D1 produziu uma média de 2,1 ovócitos, enquanto que o uso de BTS + T produziu em média 4,3 ovócitos ($P > 0,05$). No D5, o uso de BTS produziu 2,7 ovócitos e o uso de BTS + T produziu em média 3,6 ovócitos ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

As características seminais observados neste estudo, podem ser consideradas normais, em comparação com os valores citados na literatura (MARTIN RILLO, 1984).

A ausência de diferenças em motilidade e na proporção de acrossomas normais em função do diluente, condiz conforme o relatado anteriormente com relação ao diluente Reading (REVELL & GLOSSOP 1989). A redução na motilidade espermática, quando da refrigeração à 5°C para D1, concorda com resultados obtidos por WEBER (1990). A redução na motilidade no D5 em relação ao D1 foi consistente com a descrição de FRANCESCHINI & LEITE (1984).

O fato do número médio de estruturas fertilizadas e da taxa de fertilização não diferirem em função do diluente e do dia da IA, não confirmam a hipótese que a adição de trealose aumente a viabilidade do sêmen suíno, diferindo portanto dos resultados de REVELL & GLOSSOP (1989), que obtiveram um acréscimo na taxa de fertilização para o sêmen mantido em diluente contendo trealose, porém usando o diluente Reading.

Ainda é importante ressaltar que a redução da motilidade e da proporção de acrossomas íntegros do D1 para o D5 não foi relacionada com redução na taxa de fertilização, o que sugere que não houve uma associação positiva entre tempo de armazenamento, motilidade e integridade dos acrossomas com taxa de fertilização. Essa conclusão estaria em concordância com os resultados verificados por LARSSON (1985), que descreve a existência de uma pequena relação entre motilidade e lesões de acrossoma com níveis de fertilidade.

A interpretação dos resultados deste experimento deve considerar que foi utilizada uma concentração 2×10^9

espermatozóides por dose, seguindo descrição de trabalhos anteriores (BLICHFELDT *et al.*, 1988; PEDERSON, 1990), onde foram obtidos níveis adequados de fertilidade. Porém, índices superiores de fertilidade podem ser obtidos com duas ou três IA por cio, bem como pelo aumento da concentração espermática (JOHNSON *et al.*, 1988).

É importante enfatizar que as taxas de fertilização obtidas neste estudo com o sêmen utilizado no D1 e D5 não foram influenciadas pela presença de trealose no diluente.

O uso de leitões pré-púberes com ovulação induzida pode ter sido associado com uma redução artificial das taxas de fertilização observadas neste estudo. Outra potencial desvantagem seria a impossibilidade de testar o efeito de outras concentrações de trealose adicionadas ao BTS, em função da disponibilidade de animais. Também deve ser considerado o fato de um outro experimento estudar qual seria a taxa de fertilização de leitões, realizando-se o abate 30 dias após a inseminação, ou ainda após a gestação completa, para assim confirmar efetivamente as taxas de fertilização obtidas neste experimento.

CONCLUSÃO

O tempo de armazenamento do sêmen suíno reduz a motilidade espermática e a integridade de acrossomas. A adição da trealose ao diluente BTS não beneficia a motilidade espermática, integridade de acrossomas e taxas de fertilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSELY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*. v. 50, p. 535-543. 1998.
- BLICHFELDT, T.; ALMLID, T.; HOFMO, P.Q. Liquid preservation of boar semen. In: Fertility results obtained by large-scale AI in Norway. *Norway Pig Breeders Association*, Norway. 1988.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Inseminação artificial em suínos no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v. 21, n. 3, p. 13-15. 1997.

- CORRÊA, M.N. Uso de hormônios e performance reprodutiva de fêmeas suínas. In: I SIMPÓSIO DE SUINOCULTURA. Faculdade de Veterinária, UFPEL. Pelotas RS. **Anais...** 1998. p. 12-17.
- CRABO, B. G., DIAL, G. D. Artificial insemination in swine. In: **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice. Swine Reproduction.** vol. 8, n. 3, p. 533-544. 1992.
- DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T. Jr. Impacto da inseminação artificial em suínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 22, p. 75-79. 1998.
- DROBNES, E.Z.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Cold shock to pig spermatozoa is associated with phase transitions in membrane lipids. **Cryobiology.** 26 th annual meeting. 1989.
- FLOWERS, W. L., STAMBAUGH, G, HUDSON, R. et al. Combinations of natural service and artificial insemination in swine breeding programs. **J. Anim. Sci.** v. 68 (Suppl. 1), n. 483. 1990.
- FRANCESCHINI, P.H.; LEITE, F.G. Utilização do sêmen de suínos estocado a diferentes temperaturas. CONGRESSO ABRAVES Curitiba, PR. **Anais...** 1984.
- JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; GROOTEN, H.J.G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. **Zuchthyg.** v. 23, p. 49-55. 1988.
- LARSSON, K. Boar semen viability after freezing and thawing. In: L.A. Johnson and K. Larsson (Ed.). **Deep Freezing of Boar Semen**, Swed. Univ. Agr. Sci., Upsala, Sweden, p. 177-187. 1985.
- LEE, C.W.B.; WAUGH, J.S.; GRIFFIN, R.G. Solid state NMR study of trehalose/1,2-dipalmitoyl-phosphatidylcholine interactions. **Biochemistry.** v. 25, p. 3737-3742. 1986.
- MARTIN RILLO, S. How AI is progressing in Spain. **Pig International** (May), p. 24-28. 1984.
- PEDERSEN, P.N. Effect of number of sperm cells per insemination dose. 2TH INTERN. CONF. ON BOAR SEMEN PRESERVATION. Beltsville, MD. **Proceedings...** 1990. p. 398
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **J. Anim. Sci.** v. 40, p. 99-102. 1975.
- REVELL, S.G.; GLOSSOP, C.E. A long time ambient temperature diluent for boar semen. **Anim. Prod.** v. 48, p. 579-584. 1989.
- SAS®. **SAS/STAT User's Guide: Statistics Version 6.** Cary, NC: SAS® Institute Inc. 1990.
- WEBER, H. Susceptibility of boar semen to cold shock. Effects of diluent, incubation and cooling rate. **Pig News Inf.** v. 11, p. 637. 1990.