Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.60-63, jan./mar. 2007. Disponível em www.cbra.org.br

Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno[1]

Technical improvements and applicability of the deep frozen semen of the boar

Robson Carlos *Antunes*

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG
Correspondência: robson@famev.ufu.br

Resumo

O sêmen da espécie suína possui características diferentes de outras espécies animais, como o touro, por exemplo, que o torna mais susceptível ao choque pelo frio durante o congelamento e ao choque térmico no descongelamento, tornando a técnica de congelamento de sêmen de cachaço um desafio para a ciência e tecnologia. Nos últimos 20 anos houve consideráveis avanços tanto nas metodologias e equipamentos de congelamento de sêmen suíno, quanto no conhecimento da fisiologia do ciclo estral da fêmea suína, aumentando o uso desta técnica, tornando a sua aplicação comercial uma realidade tangível nos próximos anos.

Palavras-chave: cachaço, sêmen, congelamento, descongelamento.

Abstract

The boar's semen has some different characteristics compare with others species, like the bull, for example, which become him susceptible over the cold shock during the frozen and the thawing. The last 20 years a lot of knowledge about methodologies and equipments where development and a good knowledge about estral cycle of the sows were produced and the use of the deep frozen-thawing semen from boar, in next years, will be possible in commercial herds.

Keywords*: boar, semen, frozen, thawing.*

Introdução

O uso de sêmen congelado de cachaços representa apenas 1% do sêmen usado em nível mundial, apesar do mesmo estar disponível para uso desde 1975 (Saravia *et al*.; 2005). Atualmente, em nível comercial, apenas as empresas de melhoramento genético usam sêmen congelado para transferência de material genético entre granjas localizadas em diferentes países com o propósito de atualização genética e melhorias da conectabilidade dos bancos de dados, usando sêmen do mesmo cachaço em diversos rebanhos, dentro dos programas de melhoramento genético; ou seja, o uso de sêmen de cachaço congelado permanece restrito à preservação e transporte por longas distâncias de material genético de alto valor (Scheid e Silveira, 2002). No entanto, é importante ressaltar que diversos países possuem programas de conservação de raças de suínos em extinção. No Brasil, este importante trabalho é realizado pelo grupo de pesquisadores da EMBRAPA-CENARGEN em Brasília (Egito *et al*., 2002). Também há de se citar o uso de sêmen congelado de machos de alto mérito genético para repopulação de determinadas espécies após ocorrência de desastres naturais, por exemplo, surtos de doenças (Johnson *et al.*, 2000). Nestes casos especificamente, o uso do congelamento do sêmen suíno é necessário e acontece rotineiramente; pois, não se está preocupado aqui, com o número de leitões nascidos e taxa de parto correspondente, mas sim em se produzir no futuro, animais da raça em questão, se necessário for. No aspecto produtivo, este é o grande limitante do uso de sêmen congelado em granjas comerciais na atualidade; pois, enquanto com sêmen líquido resfriado e conservado até três a cinco dias, entre 15 e 18 ºC se consegue médias anuais de taxas de parto acima de 88% e nascidos totais acima de 10, com sêmen congelado, as taxas de parto, na maioria das vezes não alcança 85% e os nascidos totais não ultrapassam os 10 leitões por parto, sem contar o baixo rendimento do doador (Romero *et al.*, 2004). Apesar dos dados atuais de produtividade com sêmen congelado serem desanimadores em termos de perspectivas do uso da técnica em grande escala em rebanhos comerciais, alguns pesquisadores apontam para um futuro promissor da técnica, com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelamento de sêmen (Wolders e Ten Napel, 2005); alguns, afirmando até, que certamente o uso do sêmen congelado de suínos substituirá o uso do sêmen fresco, visualizando um futuro próximo, onde o sêmen congelado de suínos será comercializado nos grandes Centros de Inseminação Artificial e intensamente utilizado em granjas comerciais, com muito mais aceitação, onde diluentes de longa conservação serão utilizados em grandes escalas, onde o número total de células espermáticas por dose diminuirá drasticamente; e, os cachaços serão extensivamente testados individualmente, com a mais alta tecnologia, antes de serem utilizados na produção (Smits, 2006). Também é apontado como grande vantagem competitiva em

[1]Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

favor do uso do sêmen congelado a questão sanitária, que a cada dia torna-se alvo de negociações internacionais, interferindo no mercado de carne suína global, e, até mesmo em termos de diminuição do custo de produção em granjas com menos doenças; pois, em termos sanitários, o sêmen congelado leva vantagem sobre o sêmen resfriado, já que se pode verificar o estado de saúde dos doadores, antes, durante e após a produção (Smits, 2006).

Desafios do congelamento do sêmen suíno

Existem grandes diferenças entre o sêmen dos cachaços e de outras espécies animais que tornam desafiador o congelamento do sêmen desta espécie. Este problema é tão marcante que a comunidade científica sentiu a necessidade de se reunir periodicamente para discutir e apresentar os avanços conseguidos na área. Em 1985, 50 pesquisadores de 15 países reuniram-se pela primeira vez, na Suécia, para discutir exclusivamente os problemas encontrados com o congelamento do sêmen suíno. O segundo encontro aconteceu em Beltsville Maryland nos Estados Unidos em 1990, e contou com a participação de 80 pesquisadores de 17 países. Neste, não se tratou apenas do congelamento do sêmen e sim de todas as técnicas envolvidas na preservação do sêmen suíno, resfriado ou congelado.

Com isto este encontro evoluiu para o que se denomina atualmente de Conferência Internacional Sobre Preservação de Sêmen de Suíno, sendo que a de 1985 foi considerada a primeira, mesmo que nesta, o assunto tenha sido apenas congelamento e criopreservação. Esta evolução foi importante; pois, agregou mais pesquisadores ao redor do desafio de se congelar sêmen suíno e aconteceu um grande sinergismo entre os conhecimentos de outras áreas correlatas e complementares, como por exemplo, desenvolvimento de novos diluentes, melhorias das técnicas de avaliação do sêmen e do doador, técnicas diferentes e inovadoras de inseminação artificial em suínos, como é o caso das recentes técnicas de inseminação pós-cervical ou intra-uterina profunda, entre outras. A partir desta evolução, o terceiro encontro já contou com a participação de 140 pessoas de 19 países e foi realizado em Mariensee na Alemanha em 1995, e, o quarto, novamente em Beltsville Maryland nos Estados Unidos, com 254 participantes de 24 países. O último encontro aconteceu na Holanda, em Doorwerth, em 2003, mantendo o grande número de participantes e abrangência de países e o próximo acontecerá em agosto deste ano, no Canadá, em Alliston, Ontário.

As diferenças existentes no sêmen suíno provocam redução da fertilidade e podem ser explicadas por diferentes pontos de vista (Ruvalcaba *et al.,* 2003):

- mudanças estruturais e funcionais dos espermatozóides durante os processos de congelamento e descongelamento,
- viabilidade reduzida dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea suína,
- produção de embriões com menor viabilidade,
- elevada concentração espermática necessária para obter uma fecundação normal aproveitando a prolificidade normal da fêmea suína, dado o maior grau de alteração que as células apresentam após o processo de congelamento e descongelamento,
- as características anatômicas do trato genital da fêmea, que oferecem dificuldades adicionais aos espermatozóides para alcançar o oviduto,
- a necessidade de ajustar o momento da inseminação ou "timing" ao período de ovulação da fêmea, que com sêmen resfriado deve ser entre 24 horas antes da ovulação e o momento da mesma (Steverink, 1999). Com sêmen congelado ainda faltam estudos definitivos e conclusivos, mas certamente deve ser um intervalo de tempo bem menor.

Diferenças estruturais do espermatozóide suíno

Muitos autores concluíram que há diferenças na bicamada lipídica da membrana do espermatozóide suíno que podem explicar a maior susceptibilidade do mesmo ao choque pelo resfriamento (Watson, 1995; Buhr e Pettitt, 1996).

Entre as principais diferenças pode-se citar uma menor porcentagem de moléculas de colesterol (Paulenz *et al.,* 1999) e sua distribuição de maneira assimétrica na membrana, tendo uma maior quantidade na monocamada interna do que na monocamada externa (Johnson *et al.,* 2000), uma quantidade menor de fosfatidilcolina e uma quantidade maior de fosfatidiletanolamina e esfingomielina, além de diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios que possuem poucas duplas ligações do tipo *cis*.

Estas diferenças estruturais ajudam a explicar a alta sensibilidade do espermatozóide suíno ao choque pelo frio, que leva a 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 e mudanças no movimento lateral de canais (Johnson *et al.,* 2000).

Estes são os motivos pelos quais se investe em maior conhecimento da bioquímica das membranas dos espermatozóides de suínos atualmente (Brouwers *et al.,* 2005; Guthrie e Welch, 2005; Maldjian *et al*., 2005).

Considerações sobre os protocolos de congelamento e descongelamento

Devido às diferenças citadas acima, protocolos apropriados para o congelamento de sêmen suíno tiveram que ser testados e desenvolvidos nos últimos anos. No desenvolvimento de protocolos de congelamento de sêmen suíno tem-se que considerar a interação entre a concentração de crioprotetor utilizado e as velocidades de congelamento/descongelamento, que sabidamente devem ser otimizadas em conjunto (Johnson *et al.,* 2000). Os trabalhos de pesquisas desenvolvidos nos últimos anos mostram que o glicerol é o melhor crioprotetor para sêmen de suínos, mas a sua concentração não pode exceder 6% devido a toxicidade química do mesmo para os espermatozóides, sendo a concentração de 3 a 4% a mais recomendada (Holt *et al.,* 2005). A velocidade de congelamento deve ser 30 ºC / minuto e a velocidade de descongelamento de 1200 ºC / minuto (Johnson *et al.,* 2000). Outro conceito aceito entre os pesquisadores da área, diz respeito ao envase, que deve ser efetuado em palhetas de 0,5 ml; pois, os resultados são superiores a pellets ou palhetas maiores (Johnson *et al.,* 2000).

Avanços tecnológicos e aplicabilidade

Pesquisas com criomicroscópio (Holt *et al*., 2005), confirmam que há uma variabilidade muito grande na capacidade de congelamento de sêmen, entre as várias espécies (Gosden e Nagano, 2002) e dentro da mesma espécie. Vale a pena investir na determinação da capacidade de sofrer congelamento e descongelamento sem perder o poder fertilizante, do sêmen de cada cachaço, antes de submeter o mesmo, aos procedimentos de congelamento. Esta talvez, seja a área que mais contribuirá para a real aplicabilidade do uso do sêmen congelado de suínos nos próximos anos (Smit, 2006). Muitos trabalhos de pesquisas estão sendo publicados na área de avaliação de machos e pré-seleção de machos com relação à fertilidade (Rodrigues-Martinez, 2003; Fraser e Strzezeck, 2005; Gillan *et al.,* 2005; Waberski *et al.,* 2005; Andrade *et al.,* 2007). Também há avanços no desenvolvimento de novos equipamentos automatizados de controle da taxa de resfriamento que previne os danos provocados pelo choque pelo resfriamento e aumentam a taxa de recuperação da fertilidade pós-descongelamento, em relação as metodologias empregadas até o momento (Arav *et al.,* 2002; Goolsby *et al.,* 2004; Woelders *et al.,* 2005; Wolders e Ten Napel, 2005). Alguns pesquisadores acreditam e investem nas técnicas de inseminação artificial intra-uterina profunda ou pós-cervical, com pipetas modernas e modificadas, para este propósito, com o intuito de diminuir o número de espermatozóides por dose, aumentando o rendimento de produção de doses por macho doador, ajudando a viabilizar o uso do sêmen congelado em nível comercial (Roca *et al.,* 2003), apesar de outros pesquisadores não acharem imprescindível a utilização deste tipo de técnica para a viabilização do uso do sêmen congelado em nível comercial no futuro próximo (Smit, 2006). Outro avanço importante que deve ser citado é em relação ao maior conhecimento fisiológico do ciclo estral da fêmea suína, duração do cio e momento da ovulação (Steverink, 1999) e atividade uterina e transporte do sêmen até a região de fecundação (Langendijk *et al.,* 2005) que certamente melhorará o conhecimento do melhor momento para a deposição do sêmen congelado, melhorando as taxas de concepção.

Conclusões

O uso de sêmen suíno congelado em nível comercial ainda não é uma realidade, mas, os avanços tecnológicos nas áreas de conhecimento de bioquímica de membranas dos espermatozóides e o desenvolvimento de novos equipamentos automatizados para congelamento, combinados aos avanços de metodologias de avaliação e pré-seleção de cachaços antes do congelamento do sêmen e maior conhecimento do ciclo estral da fêmea suína que permitirá um melhor ajuste do "timing" da deposição do sêmen em relação à ovulação, promete tornar esta técnica comercialmente viável, em nível de granjas de produção, muito em breve.

Referências

Andrade AFC, Arruda RP, Celeghini ECC, Nascimento J, Martis SMMK, Moretti AS. Fluorescent stain method for the simultanous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrossomal membranes in boar sperm. *Reprod Dom Anim*, v.42, p.190-194, 2007.

Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*, v.187, p.77-81, 2002.

Buhr MM, Pettitt MJ. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement. *Reprod Dom Anim*, v.31, p.147-152, 1996.

Brouwers JF, Silva PFN, Gadella BM. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution of after freeze-thawing. *Theriogenology*, v.63,

p.458-469, 2005.
Egito AA, Mariante AS, Albuquerque MSM. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch Zootec*, v.51, n.193/194, p.39-52, 2002.
Fraser L, Strzezeck J. Effects of freezing: thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod Dom Anim*, v.40, p.530-536 2005.
Gillan L, Evans G, Maxiwell WMC. Flow cytometric of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.
Goolsby HA, Blanton JR, Cotter PZ, Prien SD. Preliminary trial: motility comparisons of a unique freezing technology (UFT) to liquid nitrogen mist methodology for cryopreservation of porcine spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, v.39, p.328-332, 2004.
Gosden R, Nagano M. Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*, v.123, p.3-11, 2002.
Guthrie HD, Welch GR. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, v.63, p.396-410, 2005.
Holt W, Medrano A, Thurston LM, Watson P. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, p.370-382 2005.
Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.143-172, 2000.
Langendijk P, Soede NM, Kemp B. Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around the insemination in sows. *Theriogenology*, v.63, p.500-513, 2005.
Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.411-421, 2005.
Paulenz H, Taugbol O, Kommisrud E, Grevle IS. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. *Reprod Dom Anim*, v.34, p.431-435, 1999.
Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vasquez JM, Martinez E. A Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.60, p.77-87, 2003.
Rodrigues-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Dom Anim*, v.38, p.312-318, 2003.
Romero C, Alba C, Martinez PC, Pascual MAH. Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. *Suín Cia,* v.2, n.6, p.28-33, 2004.
Ruvalcaba G, Alba C, Corcuera BD, Conde P, Higuera M, Casanova B, Martin C. Avanços nas técnicas de descongelamento e aplicação do sêmen suíno congelado. *Suín Cia,* v.1, n.3, p.42-44, 2003.
Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodrigues-Martines H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.
Scheid IR, Silveira PRS. Uma análise da IA na suinocultura brasileira .*Suín Cia,* v.1, n.1, p.25-28, 2002.
Smits H. O futuro da inseminação artificial. *Suín Cia*, v.4, n.17, p.54-56, 2006.
Steverink DBW. *Optimising insemination strategies in pigs.* 1999. 147f. Thesis (Doctorat) - Wageningen University, Wageningen, 1999.
Waberski D, Magnus F, Ferreira FM, Petrunkina AM, Weitze KF, Petersen ET. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, p.470-484, 2005
Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *In*: International Conference on Boar Semen Preservation, 3, 1995, Mariensee. *Anais***…**Mariensee, IBSP, 1995. p.135-140.
Woelders H, Matthijs A, Zuideberg CA, Chaveiro AEN. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws *Theriogenology*, v.63, p.383-395, 2005.
Wolders H, Ten Napel J. Semen in straws. *Pig Int*, v.35, n.4, p.10-14, 2005.