

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DANIELLE OLIVEIRA DE ARAÚJO

**INFLUÊNCIA DE TIPOS DE EMBALAGENS SOBRE A
QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO**

FORTALEZA-CEARÁ
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELLE OLIVEIRA DE ARAÚJO
INFLUÊNCIA DE TIPOS DE EMBALAGENS SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias da Faculdade de Veterinária
da Universidade Estadual do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: **Reprodução e**
Sanidade Animal.

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Toniolli**

Fortaleza, Ceará

2006

A662i Araújo, Danielle Oliveira

**Influência de tipos de embalagem sobre a qualidade do sêmen
suíno criopreservado/ Danielle Oliveira de Araújo
Fortaleza, 2006**

84p; il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tonioli

**Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) -
Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.**

**1. Sêmen. 2. Congelação. 3. Suíno. I. Universidade Estadual do
Ceará, Faculdade de Veterinária**

CDD 636.4

DANIELLE OLIVEIRA DE ARAÚJO

INFLUÊNCIA DE TIPOS DE EMBALAGENS SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO
CRIOPRESERVADO

Conceito: Satisfatória

Nota: 9,0 (Nove)

Aprovada em 26/ 07 /2006

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Toniolli

Orientador

Prof. Dr. Eugênio Pacelli

Prof. Dr. Airton Alencar Araújo

Prof^a. Dra. Lúcia Daniel

“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar.

Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo
Da queda um passo de dança
Do medo uma escada
Do sonho uma ponte
Da procura um encontro.”

Fernando Sabino

A Deus pela companhia e por me fazer acreditar que eu posso!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Manoel Alves de Araújo e Iraci Oliveira de Araújo pelo amor, apoio, força e pela confiança em mim depositada.

Às meus irmãos, Daniel Oliveira de Araújo, Daliane Oliveira de Araújo e Deyse Oliveira de Araújo pela admiração demonstrada e pela força que me dedicaram.

À Salete Alves de Araújo por além de ser tia tem se apresentado como um anjo em minha vida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Toniolli por me aceitar em sua equipe de trabalho.

À amiga Ana Beatriz Graça Duarte pela companhia, orientação e paciência durante todo mestrado.

À amiga Ana Cristina Carlos de Albuquerque pelo apoio durante todo o projeto, pelo companheirismo e distração nas horas fáceis e difíceis.

À amiga Michelle Costa e Silva por nunca me deixar desistir e sempre me socorrer durante todo o mestrado.

A toda equipe do LRSTS, Rocilda Oliveira, Mariana de Souza Pimentel, Ângela Silva dos Santos, Darlete Matos, Iara Gonçalves, Eveline Lanzillotti Gomes, Valdevânia Araújo, Emanuelle Ribeiro Vasconcelos e aquelas que não estão mais no laboratório, mas que estiveram presentes no meu trabalho e estão no meu coração, Camilla Oliveira, Roberta Nogueira, Gabriella Queiroga e Ádila Araújo.

À equipe da Conceptus, Dr. Marcelo de Pontes Rocha, Dra. Marjorie Luzia Costódio Mota Dias, Dr. Marcelo Borges Cavalcante, Dr. José Oswaldo Queiroz Dias, Maura de Oliveira Fernandes, Valdenia Furtado Rodriguez e Roseane de Oliveira Fernandes.

À amiga Carolina Sidrim Cavalcante que sem perceber me dava ânimo nas horas difíceis.

À Magda pelo incentivo no período mais crítico.

Ao amigo Francisco Atualpa Soares Júnior pela disposição em me ajudar sempre que precisei.

Ao amigo Erivelton Rodrigues que me ajudou num momento de sufoco.

Ao amigo Antônio Sérgio Varela Júnior pelas dúvidas esclarecidas sempre que lhe recorri.

A todos que de alguma forma me ajudaram e incentivaram na execução deste trabalho, obrigada.

RESUMO

O sêmen suíno criopreservado vem sendo bastante estudado, entretanto, seu uso ainda é esporádico devido à alta sensibilidade desta célula aos protocolos de criopreservação, levando um reduzido número de células viáveis após a descongelação das amostras criopreservadas. Este reduzido número deve-se a vários fatores que comprometem a célula durante todo protocolo de congelação. Deve-se levar em consideração, a complexidade bioquímica da célula em questão, a interação celular com os componentes do meio crioprotetor, a influência do resfriamento, congelação e descongelação, e ainda a forma da embalagem a ser escolhida para o armazenamento das células sendo necessário o desenvolvimento de métodos de congelação mais eficientes. Neste trabalho, foi avaliada a influência de diferentes tipos de embalagens utilizadas, para o armazenamento de sêmen suíno, sobre a qualidade do espermatozóide criopreservado. Foram congeladas 35 amostras de animais em palhetas de 0,5 mL, criotubos de 2,0 mL, macrotubos de 4 e 5 mL, sendo analisadas quanto ao vigor (0 a 5), motilidade (0 a 100%) e morfologia espermáticas antes e após a descongelação em cada embalagem. O sêmen embalado em palhetas de 0,5 mL apresentou resultados significativamente melhores em todos os parâmetros, quando comparados aqueles preservados nas outras embalagens. O vigor e a motilidade foram respectivamente de 2,3 e 45,4% para amostras congeladas em palhetas, 1,4 e 26,5% em criotubos, 1,5 e 26,3% em macrotubos de 4 mL e 1,3 e 29,6% em macrotubos de 5 mL. A morfologia espermática foi analisada quanto à existência de acrossoma intacto, sendo encontrado 60,4% de espermatozoides com acrossoma intacto nas amostras descongeladas em palhetas, 53,6% em criotubos, 54,1% e 52,9% em macrotubos de 4 e 5 mL, respectivamente. Desta forma, os resultados apresentados pelo sêmen envasado nas palhetas foram aqueles que apresentaram características pós-descongelação condizentes com a possibilidade de serem utilizados nos protocolos de criopreservação de sêmen suíno.

ABSTRACT

Cryopreserved swine semen is being quite studied. However, its use is still sporadic due to this cell high sensibility to the cryopreservation protocols, taking a reduced number of viable cells after the thawing of the Cryopreserved samples. This reduced number is due to several factors that commit the cell during every freezing protocol. It should be considered the cell biochemical complexity, the cellular interaction with the components of the cryoprotector way, the influence of the cooling, freezing and unfreezing, and the chosen packing method for the storage of the cells, making necessary the development of more efficient freezing methods. In this work the influence of different types of packaging used for swine semen storage was evaluated, concerning the quality of the cryopreserved spermatozoa. 35 samples of animals were frozen in straws of 0.5 ml, cryotubes of 2.0 ml, maxi-straws of 4 and 5 ml, being analyzed as for the energy (0 to 5), mobility (0 to 100%) and spermatic morphology before and after the thawing in each packaging. The semen frozen in straws of 0,5 ml presented significantly better results in all of the parameters, when compared to those preserved in the other packagings. The energy and the mobility were respectively from 2.3 and 45.4% to frozen samples in straws, 1.4 and 26.5% in cryotubes, 1.5 and 26.3% in maxi-straws of 4 ml and 1.3 and 29.6% in maxi-straws of 5 ml. The spermatic morphology was analyzed as for the existence of intact acrossome, being found 60,4% of spermatozoids with intact acrossome in the unfrozen slats samples, 53,6% in cryotubes, 54.1% and 52.9% in maxi-straws of 4 and 5 ml, respectively. This way, the results presented by the semen in the straws were the ones that presented powder unfreezing characteristics that were more suitable with the possibility to be used in the swine semen cryopreservation protocols.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Coleta do ejaculado	32
Figura 2 – Retirada da gaze que retém a porção gel do ejaculado	33
Figura 3 – Representação dos momentos de abaixamento da temperatura	37
Figura 4 – Embalagens utilizadas no projeto	38
Figura 5 – Freezer para envase das amostras	39
Figura 6 – Rampa de congelação	39
Figura 7 – Botijões de nitrogênio	40
Tabela 1 – Comparação entre as características seminais avaliadas	45
Figura 8 – Análise do vigor espermático	46
Figura 9 – Análise da Motilidade espermática	47
Figura 10 – Avaliação da Taxa de degradação média	48
Figura 11 – Análise da Morfologia espermática	49

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
1.0. Criobiologia	16
1.1. <i>Criopreservação</i>	17
1.2. <i>Integridade da membrana</i>	17
1.3. <i>Crioinjúrias</i>	20
1.4. <i>Meios crioprotetores</i>	21
1.5. <i>Diluidores de ressuspensão</i>	24
2.0. Tipos de embalagem	25
3.0. Avanços na técnica da criopreservação	27
4.0. Criopreservação do espermatozóide suíno	28
JUSTIFICATIVA	29
HIPÓTESE CIENTÍFICA	30
OBJETIVOS	31
<i>Geral</i>	31
<i>Específicos</i>	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
5.0. Coleta e análise do sêmen <i>in natura</i>	32
5.1. <i>Animais e coleta do sêmen</i>	32
5.2. <i>Análise do sêmen</i>	33
5.2.1 <i>Vigor e motilidade</i>	33
5.2.2. <i>Taxa de degradação média da motilidade</i>	33
5.2.3 <i>Morfologia</i>	34
6.0. Técnica de congelamento	34

6.1. <i>Técnica de congelação do sêmen</i>	34
6.2. <i>Embalagem do sêmen</i>	38
6.3. <i>Congelação das amostras</i>	39
7.0. Descongelação e ressuspensão	40
7.1. <i>Descongelação e ressuspensão do sêmen</i>	40
8.0. Análise das amostras	41
8.1. <i>Vigor e motilidade do espermatozóide</i>	41
8.2. <i>Avaliação morfológica do espermatozóide</i>	41
8.3. <i>Momento das análises</i>	42
9.0. Análise estatística	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	52
PERSPECTIVAS	53
ARTIGO ANEXO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	81

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (I.A.) é uma importante ferramenta para a distribuição de genética superior, tendo sido utilizada em diversas espécies incluindo, bovino, suíno, ovelha e búfalo (Sukhato, *et al.*, 2001). A I.A. em suínos, com sêmen resfriado vem sendo utilizada com sucesso em vários países. No Brasil, em 1975, houve a criação das primeiras centrais de I.A. na região sul com um avanço lento da utilização desta técnica pelos criadores. Em 1990, apenas cerca de 2% do rebanho nacional era inseminado (Scheid, 1991).

Assim como em outras espécies, búfalo (Sukhato, *et al.* 2001), bovino (Papa, *et al.*, 2000), cabra (Purdy, 2005), dentre outras, o sêmen suíno criopreservado vem sendo bastante estudado, entretanto, seu uso tem sido limitado a protocolos para melhoramento genético. Pesquisadores têm procurado melhorar as técnicas de criopreservação para aumentar sua área de utilização (Córdova, *et al.*, 2002). Os primeiros resultados positivos de fertilidade, com a utilização de sêmen suíno congelado foram obtidos no início da década de 70, inicialmente com I.A. realizada diretamente no oviduto de marrãs em estro e depois com I.A. intra-cervical. (Bernardi *et al.*, 2005).

A fertilidade de um rebanho é uma resultante de três fatores: fertilidade da porca, fertilidade do varrão e manejo reprodutivo. Na teoria, estes três componentes influenciam na mesma intensidade. No entanto, de acordo com Flowers (1997) a função do varrão dentro de uma suinocultura, é cerca de 15 vezes mais importante que a fertilidade de uma porca isoladamente e representa a metade da influência do manejo reprodutivo geral. Portanto, aspectos relacionados à coleta, avaliação e processamento do sêmen do varrão são de grande importância para o sucesso da IA (Reis, 1997).

A célula espermática de mamíferos e, em particular, a suína é altamente sensível à criopreservação (Watson & Plummer, 1985), sendo de grande importância o conhecimento acerca dos danos provocados a esta célula, pela agressão térmica durante todo o processo de congelação. Neste processo, deve-se levar em consideração diversos fatores tais como, a complexidade bioquímica do

espermatozóide, a interação de seus componentes e a influência do resfriamento, congelação e descongelação (Parks & Graham, 1992). Portanto, torna-se importante a compreensão dos danos causados pelo estresse térmico e as respostas dos espermatozoides ao abaixamento da temperatura, sendo necessário o desenvolvimento de métodos de congelação mais eficientes (Bwanga, 1991).

A redução da fertilidade pós-descongelação é atribuída à alteração estrutural e funcional da membrana celular espermática durante todo o processo (Papa, *et al.*, 2000). Propõe-se que as lesões causadas na membrana da célula espermática durante o resfriamento se devam à reorganização dos lipídios durante este processo e, posteriormente ao reaquecimento, comprometendo assim as associações lipo-lipídicas e lipo-proteicas interferindo na função e na integridade da membrana (Parks & Graham, 1992). Na realidade, o maior problema da criopreservação não é a habilidade do espermatozóide em permanecer viável à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas sim, os danos resultantes dos processos de resfriamento e descongelação entre as temperaturas de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mazur, 1985).

As pesquisas efetuadas durante os últimos 30 anos resultaram em avanços originados, sobretudo, dos estudos efetuados para avaliação do efeito de diferentes crioprotetores, embalagens para congelação, diluentes e curvas de congelação e descongelação. No entanto, o emprego de sêmen congelado ainda está associado à redução de 10 a 20% na taxa de parto e de 1 a 2 leitões por leitegada quando comparado ao sêmen resfriado (Bernardi, *et al.*, 2005).

Para o uso de sêmen suíno congelado em programas de I.A., o método de embalagem do sêmen tem sido motivo de estudo para alguns autores, já que diferentes resultados na qualidade da amostra descongelada têm sido obtidos de acordo com o tipo de embalagem utilizada, sendo sugerido que o raio da embalagem tem influência direta na proporção de células viáveis no processo de criopreservação (Eriksson & Rodriguez-Martinez, 2000; Córdova *et al.*, 2002).

REVISÃO DE LITERATURA

1. 0. Criobiologia

A palavra “criobiologia” tem origem do termo grego “kryos” (exprime a idéia de frio) e é definida como o estudo da vida em temperatura extremamente baixa. Dessa maneira, fica claro que os termos criopreservação e congelação não são sinônimos. O primeiro significa preservar células guardando-as a baixas temperaturas, o segundo é a mudança do estado da matéria de líquido para sólido (Cavalcante, 2004). Quando células são criotj 1 0 0 1 277.4488.88 577.44 T0e

1.1. Criopreservação

A criopreservação tem como principal objetivo manter a integridade estrutural e viabilidade celular após submeter as células à baixas temperaturas por um determinado período de tempo. Esse processo gera danos celulares conhecidos como crioinjúrias, que surgem devido a fatores tais como: a toxicidade dos crioprotetores, o choque osmótico, a formação de cristais de gelo intra e extracelular e os danos de fratura no material genético da célula (Holt, 2000; Watson, 2000; Kasai *et al.*, 2002).

Ao serem congelados, os espermatozóides são expostos a vários fatores estressantes: transição de fase dos fosfolipídios da membrana, estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores, desidratação por aumento da concentração de solutos e a formação e dissolução de cristais de gelo. Em função disto, alterações podem ocorrer, tais como quebra da assimetria da membrana e conseqüente alteração da permeabilidade, modificações no citoesqueleto, na arquitetura das mitocôndrias, na condensação da cromatina, entre outras (Watson, 1995). Estes eventos contribuem para a formação de defeitos na membrana e nas organelas, que acabam por afetar a integridade funcional das células (Bwanga *et al.*, 1991; Watson, 2000).

1.2. Integridade de membrana

Os eventos físico-químicos da congelação que ocorrem durante a manipulação, criopreservação e estocagem são irreversíveis provocando alterações na estrutura da membrana espermática, aumenta a sensibilidade ao dano resultante da peroxidação lipídica, alteração na fluidez e instabilidade da membrana, comprometimento nuclear, perda dos componentes intracelulares e queda da motilidade espermática (Papa, *et al.*, 2000).

Já é de conhecimento que a criopreservação afeta a integridade da membrana de modo a comprometer a viabilidade celular após o processo (Bwanga *et al.*, 1991). Segundo Parques & Lynch (1992), diferenças na composição de ácidos

graxos e lipídios entre as espécies são fatores importantes durante o processo de abaixamento de temperatura. Buhr (1999) propôs a ocorrência de modificações lipídicas devido ao protocolo de congelação comprometendo a membrana plasmática da cabeça do espermatozóide. A descongelação envolve uma reversão destes efeitos, e, conseqüentemente, o influxo de água para o interior poderá causar o rompimento da membrana, sendo que estes efeitos podem alongar ainda mais os danos devido a condições hiperosmóticas (Mazur *et al.*, 1970).

Acredita-se que, parte das diferenças na sensibilidade dos espermatozoides ao choque térmico estejam relacionadas com seu conteúdo lipídico. Não só as diferenças na composição total parecem ser importantes, mas a composição das membranas em diferentes regiões da célula espermática parece assumir papel importante na determinação da sensibilidade às baixas temperaturas (Watson & Plummer, 1985). Foi demonstrada que a criopreservação do espermatozóide suíno está relacionada a modificações na composição lipídica (fosfolipídios, ácidos graxos, colesterol, triglicerídios) e conseqüentes alterações na fluidez da membrana na porção da cabeça do espermatozóide (Buhr *et al.*, 1994; Buhr & Pettitt, 1996; Cerolini *et al.*, 2001).

A primeira mudança que os espermatozoides têm que enfrentar ao serem submetidos ao processo de criopreservação, é a transição de fase dos lipídeos de membrana, decorrente da diminuição da temperatura, antes da congelação propriamente dita. Os aspectos referentes a esta mudança foram revisados e descritos por Watson em 1996.

À medida que a temperatura diminui, os fosfolipídios apresentam restrição na sua movimentação lateral. Em dupla camada artificial de lipídeos, os fosfolipídios puros passam de uma fase fluida para uma fase gel a uma determinada temperatura, a chamada temperatura de transição, abaixo da qual os fosfolipídios formam um arranjo regular. Nas membranas naturais, a natureza dos fosfolipídios é mista e há grande variedade de possibilidades de composição das cadeias laterais; a temperatura de transição de fase para os lipídios da membrana é mais ampla, mas para cada grupo de fosfolipídios, a transição ocorre na faixa de temperatura restrita. Em função desta variação na temperatura de transição para os diferentes grupos de lipídios, a separação

lateral pode acontecer. Como consequência, podem ser formados locais ocupados somente por lipídios e as proteínas ficam agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado fluido (Watson, 1996).

A natureza e proporção dos lipídios, juntamente com as proteínas, controlam a fluidez da membrana. Muitas funções celulares dependem das proteínas da membrana e a fluidez da membrana é essencial para estas funções, por manter a mobilidade das proteínas (Watson & Plummer, 1985). Pelo fato de estarem em ambiente lipídico não fisiológico, por ocasião da separação lateral, a função das proteínas de membrana, necessárias para a integridade estrutural ou para o funcionamento das bombas de íons, pode ser afetada (Woelders, 1997).

O colesterol, um dos principais componentes da membrana espermática, interfere no comportamento dos lipídios, ampliando a sua transição de fase, prevenindo, portanto, mudanças bruscas e minimizando a separação de fases. A membrana plasmática do espermatozóide suíno apresenta uma relação colesterol/fosfolipídios mais baixa de que em outras espécies, sendo para os espermatozóides de suínos de 0,12, para os de bovinos 0,38 e para os de ovinos 0,36 (De Leeuw *et al.*, 1990), isto pode ser um dos fatores responsáveis por sua maior sensibilidade ao resfriamento (De Leeuw *et al.*, 1990; Parks & Lynch, 1992).

Além do menor conteúdo de colesterol, Parks & Lynch (1992) observaram ainda que espermatozóides suínos apresentam maior relação proteína/fosfolipídios na membrana plasmática numa proporção de 1,26 em relação ao espermatozóide de outras espécies menos sensíveis ao choque térmico como eqüinos (0,86), bovinos (0,80) e galos (0,46). Os mesmos autores salientam que a fração glicolipídica da membrana de espermatozóides suínos possui um ponto de fusão relativamente alto e proporção elevada de etanolamina. O conjunto destes aspectos aumentaria a probabilidade de mudanças irreversíveis na membrana, advindas da separação lateral de fase e de alterações na interação lipídios-proteínas tornando os espermatozóides suínos mais sensíveis que os de outras espécies.

Do conteúdo total de lipídios existentes nos espermatozóides suínos, aproximadamente 75% são fosfolipídios e 24% colesterol (Celorini *et al.*, 2001). Apesar das diferenças entre espécies, nas classes dos fosfolipídios espermáticos (De Leeuw *et al.*, 1991), pouca variação foi observada no pico de temperatura de transição dos fosfolipídios de membrana, a qual foi de 24 °C para os espermatozóides suínos, e entre 21 e 25 °C para os espermatozóides de garanhões, perus e touros (Parks & Lynch, 1992). Hammersted *et al.*, (1990) citam que mudanças drásticas ocorrem nas propriedades físicas da membrana entre 15 e 20 °C. Watson (2000), relata que a mudança de fase dos lipídios se concentra na faixa de 5 °C a 15 °C, mas a mesma pode não estar completa até 0 °C. Isto significa dizer que durante o processo de criopreservação, os espermatozóides suínos, ao serem mantidos em equilíbrio a 15 e a 5 °C, estão sendo submetidos aos efeitos da transição de fase dos lipídios da membrana.

1.3. Crioinjúrias

Foi observado que a rápida congelação traz conseqüências deletérias devido à formação de cristais de gelo. O rompimento da membrana citoplasmática por esses cristais pode ser associado ao crescimento destes também durante o degelo e recristalização (Watson, 1990).

A formação de cristais de gelo, intra ou extracelular, durante a criopreservação depende da velocidade de queda da temperatura. O resfriamento lento forma cristais de gelo no meio extracelular levando a uma desidratação da célula, devido sua exposição a um meio hiposmótico por um período longo, fenômeno conhecido como “efeito solução” (Holt, 2000). No resfriamento rápido se observa a formação de cristais de gelo no interior da célula podendo provocar lesões de organelas celulares. Ambas as formas de resfriamento causam danos celulares. Assim, a velocidade de resfriamento ideal deveria ser lenta o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, mas de certa forma rápida para diminuir o efeito solução (Holt, 2000; Leibo *et al.*, 2002).

1.4. Meios Crioprotetores

A presença de soluções de altas concentrações e de baixo peso molecular reduz os efeitos dos danos da desidratação

substâncias vêm sendo utilizadas como aditivos na proteção das células antes do abaixamento de temperatura. A adição de proteínas como caseína e gema de ovo, vêm sendo utilizadas para proteção dos espermatozóides ao choque térmico (Pursel *et al.*, 1973).

Almlid *et al.* (1989) estudaram o efeito do glicerol a 2 e 4 % sobre parâmetros tais como: motilidade, integridade da membrana e capacidade de penetração em oócitos; encontrando melhores resultados quando utilizaram este crioprotetor na concentração de 4%. A temperatura de adição do glicerol e o tempo de exposição a este crioprotetor ao sêmen suíno podem reduzir significativamente a qualidade espermática após a descongelação, bem como quando utilizado em concentrações acima de 4% (Almlid & Johnson, 1988). Segundo Thilman (1977), a utilização do glicerol à 2% para a congelação do sêmen em palhetas de 0,5 mL, resultaram na recuperação de maiores percentuais de espermatozóides com acrossoma intacto do que com adição de glicerol à 5 ou 7%, entretanto, os resultados de motilidade e viabilidade (porcentagem de espermatozóides vivos) após o teste de termorresistência com o mesmo crioprotetor a 2%, são reduzidos, quando comparados com os resultados utilizando-se maiores concentrações.

Na tentativa de diminuir os danos celulares durante a criopreservação, a adição de substâncias crioprotetoras passou a ser utilizada rotineiramente (Polge *et al.*, 1949; Smith & Polge, 1950). Eles podem ser divididos em dois grupos, os permeáveis (glicerol, dimetilsulfóxido, etanol) e os não permeáveis (sacarose, glicose, dextran). Geralmente, são utilizadas composições contendo os dois tipos de crioprotetores (Kasai *et al.*, 2002).

O glicerol até agora é o crioprotetor mais utilizado no sêmen suíno em processos de criopreservação (Watson, 1995), embora se reconheça que esta substância não é o crioprotetor ideal para o espermatozóide suíno. Em concentrações crescentes de glicerol, eleva-se a motilidade espermática pós-descongelação, porém o percentual de espermatozóides com acrossoma intacto diminui (Scheid, 1980). Os crioprotetores exercem uma importante função na proteção da célula espermática dos processos de congelação e descongelação. (Gonzalez, 2004)

Com o surgimento do glicerol como meio crioprotetor houve uma melhora nos resultados. Porém, encontrar o meio crioprotetor ideal não é tarefa fácil. O próprio glicerol é utilizado em diferentes concentrações, dependendo da espécie animal, devido a sua agressão tóxica à célula (Critser *et al.*, 1988). A concentração de glicerol é lesiva aos espermatozóides do suíno se for adicionado a mais de 3%, do bovino a mais de 8% e do rato a mais de 1,7% (Holt, 2000).

No processo de congelação, os espermatozóides são submetidos a várias mudanças de volume celular, às quais devem se ajustar para sobreviver. Estas mudanças resultam em estresse osmótico para a célula (Courstens & Paquignon, 1985; Hammerstedt *et al.*, 1990; Parks & Granam, 1992; Watson, 1995) e ocorrem durante diversas etapas do procedimento: exposição ao crioprotetor; congelação e descongelação da água extracelular e saída do crioprotetor.

Foi demonstrado por Gilmore *et al.* (1998) que os espermatozóides suínos são mais sensíveis às mudanças osmóticas que os de humanos e de camundongos. Estas células podem suportar retração e expansão de apenas 0,97 e 1,02 vezes seu volume isosmótico, respectivamente, de modo a manter motilidade superior a 70%. Estes limites de tolerância se ampliam um pouco no sêmen diluído, o que pode ser o resultado da modificação ou estabilização da membrana plasmática, devido aos componentes do diluente. A alta sensibilidade dos espermatozóides suínos ao choque osmótico indica que a adição e remoção do crioprotetor em passos poderia minimizar o problema e talvez, resultar em maiores índices de sobrevivência. No entanto, protocolos do congelação deste tipo poderiam não ser práticos, além de aumentarem ainda mais o tempo de processamento das doses congeladas.

De acordo com Hammerstedt *et al.*, (1990), é provável que haja ligação entre a morfologia dos espermatozóides de várias espécies e sua habilidade em tolerar as alterações osmóticas de volume. Watson & Plummer (1985) também chamavam a atenção para a possível correlação entre a sensibilidade ao choque térmico e a morfologia da cabeça; espermatozóides das espécies mais sensíveis ao choque térmico seriam os que apresentam cabeças maiores e mais achatadas, enquanto os mais resistentes teriam cabeças menores e menos achatadas, com membranas mais convexas. No entanto, os espermatozóides bovinos, ovinos e suínos, os quais

apresentam a morfologia da cabeça semelhante, diferem na sua sensibilidade a congelação (Holt, 2000).

1.5. Diluidores de ressuspensão

Para ser produzida uma dose inseminante, seja ela resfriada ou congelada, é necessário um meio de ressuspensão que apresente nutrientes necessários para proteger o espermatozóide prolongando sua vida *in vitro* e ainda aumentar o volume do ejaculado, são os chamados diluidores (Simmet, 1996). Existem basicamente dois grupos de diluidores e estes grupos são determinados pela capacidade de conservação do sêmen, sendo classificados em diluidores de curta ou longa duração (Reis, 1997). Os diluidores de curta duração apresentam composição de simples, geralmente são compostos apenas por produtos salinos como glicose, citrato de sódio, bicarbonato de sódio e cloreto de potássio. Estes diluidores têm a capacidade de preservar a viabilidade do sêmen por aproximadamente até quatro dias; Já os diluidores classificados como de longa duração apresentam composições mais complexas e, conseqüentemente, têm custo superior. Em média eles têm a capacidade de preservar as células por até 7 dias (Simmet, 1996).

Vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar a eficácia dos diluidores. Toniolli *et al.* (1996) demonstraram que o ácido 3-indol acético acrescido ao diluidor BTS melhorou as condições de conservação do sêmen de varrão, com um efeito significativamente favorável sobre a percentagem de espermatozoides com acrossoma intacto a uma temperatura entre 15 e 17 °C e acondicionados por 13 dias. Na espécie suína, os resultados de fertilidade de fêmeas inseminadas com sêmen congelado têm ficado abaixo das expectativas, fornecendo sempre leitegadas de tamanho menor (Toniolli, 1991). Uma fração rica da água de coco adicionada ou não ao diluente BTS, foi testada *in vivo* na diluição de sêmen suíno e os resultados mostraram que a prolificidade (nascimentos vivos por fêmea) foi similar nos diferentes grupos, tendo a fertilidade não diminuído quando a água de côco foi adicionada ao diluente BTS (Toniolli *et al.*, 1995). Desta forma, o BTS tem sido utilizado com resultados bem satisfatórios para a ressuspensão de amostras sejam elas resfriadas ou descongeladas.

2.0. Tipos de embalagens

A criopreservação das células espermáticas apresenta várias etapas que devem ser levadas em consideração, porém para ser congelado o sêmen deve ser processado, resfriado, congelado, armazenado e descongelado, e ainda recuperar o maior número de características fisiológicas possíveis para que ocorra a fecundação. Outro fator que deve ser considerado é a variabilidade da fisiologia bioquímica do espermatozóide de cada espécie e ainda a variação na anatomia e fisiologia do transporte espermático no trato genital feminino, onde o número de células necessárias para se conseguir a fecundação varia de acordo com o trato genital de cada espécie (Holt, 2000).

Tem sido avaliada a possível influência da forma da embalagem do sêmen nos resultados de congelação e descongelação. Após os primeiros trabalhos de congelação em ampolas ou tubos de vidro, vários protocolos foram desenvolvidos para congelação do sêmen suíno sob a forma de *pellets* em meados da década de 70. Os *pellets* são normalmente preparados pela colocação de 20 mL de sêmen em depressões formadas em blocos de gelo seco, sendo posteriormente armazenados em nitrogênio líquido, dentro de tubos de 10 a 15 mL. Devido aos riscos de contaminação, dificuldade de armazenamento e manipulação dos *pellets*, vários estudos foram posteriormente efetuados no sentido de encontrar embalagens que fossem adequadas para o congelação, armazenamento e manipulação das doses inseminantes congeladas. Bernardi, *et al*, 2005).

Várias embalagens são encontradas atualmente para criopreservação de células espermáticas tais como: pílulas que apresentam uma relação volume-superfície facilitando uma melhor distribuição da temperatura, porém, seu volume limitado necessita de um número considerável de ampolas para reconstituir uma única dose inseminante: macrotubos apresentando acomodações para 4 ou 5 mL, ao contrário das ampolas, com apenas uma ou duas destas embalagens se consegue uma reconstituição de uma dose para inseminação, porém, sua dimensão geométrica não facilita a transmissão uniforme da temperatura e as zonas periféricas ficam em exposição direta a temperaturas extremas de congelação e descongelação; palhetas, estas podem ser de 0,25 ou 0,5 mL. Apresentam boa transmissão de temperatura do

exterior ao meio interior, porém, seu volume dificulta a ressuspensão de uma dose inseminante, pois como as pílulas, fazem-se necessárias a descongelação de várias palhetas; bolsas plásticas apresentando-se em volume de 5,0 mL e uma geometria que facilita uma congelação e descongelação rápida e uniforme, no entanto, há dificuldades para seu armazenamento em tanques de nitrogênio líquido (López, 2006).

Existe ainda uma embalagem utilizada para armazenamento de sêmen humano, os criotubos, pequenos tubos plásticos com capacidade para dois e oito mililitros (Cavalcante, 2004).

Córdova *et al.* (2002) propuseram que a forma e o volume do recipiente para armazenamento do sêmen poderiam influenciar na qualidade do sêmen criopreservado. O choque térmico entre as regiões periféricas e centrais do recipiente pode induzir danos ao acrossoma do espermatozóide durante o processo de criopreservação. Observou-se que essa influência da embalagem realmente existe.

Para serem adequadas, as embalagens devem propiciar velocidades de congelação e descongelação que sejam uniformes (Hofmo & Almlid, 1991), sendo sugerido que uma maior relação superfície/volume deveria contemplar estas características. Neste sentido, vários trabalhos resultaram em maior qualidade espermática após descongelação, quando foram usados macrotubos achatados (1,7 mL) ou palhetas de 0,5 ou 0,25 mL, em comparação aos macrotubos com volume de 5 mL (Fazano, 1986; Moura, 1988; Stampa, 1989; Bwanga *et al.*, 1990, 1991b e 1991d; Berger & Fischerleitner, 1992; Simmet, 1993). A velocidade de descongelação do centro da dose, mantida em macrotubos, é 3,7 vezes menor que a observada na periferia, mas esta variação não ocorre nas doses congeladas em macrotubos achatados (Weitze *et al.*, 1991). Eriksson & Rodríguez-Manínez (2000) também atribuem os melhores resultados de motilidade das amostras congeladas em bolsas, em comparação aos macrotubos, à maior velocidade de descongelação. Em seu estudo, Rodrigues-Martinez (2000), analisaram amostras pós-descongelação em macrotubos e em sacolas plásticas, ambos com capacidade para armazenar 5mL de ejaculado. Os macrotubos apresentaram uma variação de temperatura entre a periferia e o centro da amostra, sendo a motilidade pós -descongelação melhor nas sacolas.

Desta forma propôs-se que o tipo de embalagem tem uma real influência sobre a qualidade de espermatozóides viáveis após o processo de criopreservação.

3.0. Avanços na técnica de criopreservação

O estudo dos danos produzidos durante o processo de congelação, abaixamento de temperatura e pelas suas embalagens tem crescido muito. Na medicina humana, a criopreservação já vem sendo praticada rotineiramente, onde células sangüíneas e sexuais são congeladas e descongeladas para posteriormente serem diferentemente utilizadas. No entanto, em muitos casos, as taxas de sobrevivência celular são muito baixas, levando a ciência a buscar melhorias nas técnicas de criopreservação celular (Wolf, 2004).

O potencial de fertilização do espermatozóide criopreservado tem sido estudado a mais de 50 anos e até recentemente não se tinha ainda informações suficientes na literatura que permitissem uma avaliação dos danos causados à membrana celular, bem como, ainda não há evidências conclusivas sobre a capacidade fertilizante dos espermatozóides submetidos ao processo de criopreservação (Marcus-Braun *et al.*, 2004).

Os processos de resfriamento, congelação e descongelação causam alterações na estrutura da membrana espermática. Foi constatado que o sêmen suíno pós-descongelação apresentou uma proporção maior de espermatozóides com reação acrossômica que o sêmen *in natura* depois de submetido à técnica de swim-up. Conseqüentemente, o sêmen descongelado foi capaz de penetrar imediatamente oócitos suínos em um sistema de fertilização *in vitro*, sem a necessidade de um período de incubação, para ativar a capacitação do sêmen *in natura* (Clarke & Johnson, 1987). Além disso, concluíram que o sêmen suíno congelado após uma seleção de uma sub-população móvel de espermatozóides é mais indicado para fertilização *in vitro*, pois as taxas de penetração são similares as do sêmen *in natura* com menor freqüência de polispermia e maior freqüência de formação de pronúcleo (Zheng, 1992).

4.0. Criopreservação do espermatozóide suíno

Os primeiros trabalhos de congelação do sêmen de varrão começaram na década de 1950. Vários autores (Crabo & Einarsson, 1971; Grahan *et al.*, 1971; Pursel & Johnson, 1971) conseguiram manter um nível de fertilidade aceitável com sêmen suíno através de inseminações intracervicais, entretanto o emprego do sêmen suíno congelado ainda é esporádico e limitado a eventuais importações para a introdução de material genético em programas de melhoramento genético e trabalhos experimentais (Scheid *et al.*, 1982). Embora a tecnologia venha sendo aprimorada, os resultados da aplicação dos métodos de conservação do sêmen suíno congelado, ainda são insuficientes, apresentando níveis mais baixos de fecundidade em relação à monta natural ou à inseminação artificial, utilizando sêmen resfriado.

Durante as últimas três décadas, foram elaborados muitos diluidores, sendo a maioria para protocolos particulares, de forma que geralmente não são transferíveis de um método para outro (Osinowo & Salamon, 1976). Segundo Watson (2000), os efeitos da criopreservação podem induzir danos irreversíveis e letais ao espermatozóide sendo de grande importância os estudos aos numerosos danos provocados a esta célula na tentativa de minimizar estes efeitos.

A criopreservação de sêmen suíno é pouco utilizada em prática comercial. As principais razões são a baixa taxa de sobrevivência do espermatozóide e uma necessidade de alta concentração de células espermáticas viáveis para uma dose inseminante. Armazenar sêmen suíno a 16 – 18 °C é o método mais comum para poucos dias e tem sido bem aceito obtendo boas taxas de fertilidade. Ainda assim, a criopreservação é uma valiosa técnica, especialmente, como já citado, para conservação material genético, ou assegurar um constante abastecimento de sêmen em casos de um temporário problema epidemiológico ou de baixa produção de sêmen pelos animais, devido a condições adversas (Cerolini *et al.*, 2001).

JUSTIFICATIVA

Como citado, a inseminação em suínos com o uso de sêmen congelado é ainda reduzida devido à baixa recuperação de células espermáticas viáveis após a criopreservação. Para uma melhor recuperação celular devem-se levar em consideração diversos fatores tais como: a complexidade bioquímica da célula em questão, a interação com os meios crioprotetores e o método de embalagem do ejaculado. Neste sentido, a escolha da embalagem pode influenciar diretamente os resultados das amostras pós-descongeladas, influenciando assim na taxa de fertilização dos protocolos de inseminação artificial suína. (Bernardi, *et al*, 2005).

Diversos tipos de embalagens de capacidade para 5 mL de sêmen, visando a criopreservação do sêmen suíno tem sido propostas (Eriksson e Rodriguez-Martinez, 2000). No entanto, devido ao seu grande volume elas apresentam a desvantagem de submeter o sêmen a diferentes temperaturas, sendo também o armazenamento destas embalagens mais trabalhoso.

Palhetas de 0,5 mL são largamente utilizadas para criopreservação em diferentes espécies (Larsson, 1978, Kirk, *et al*, 2005) e na congelação de sêmen suíno tem apresentado resultados satisfatórios (Bwanga, *et al*, 1990, Simmet, 1993), no entanto para se obter uma dose inseminante faz-se necessário em média 40 palhetas por animal sendo este número considerado trabalhoso. Nos processos de congelação e descongelação de sêmen humano (Cavalcante, 2004) a utilização de criotubos tem apresentado resultados significativamente melhores quando comparados a palhetas de 0,25 mL, no entanto esse tipo de embalagem ainda não foi utilizado em protocolos de criopreservação de sêmen suíno.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

O criotubo de 2 mL em relação à palheta de 0,5 mL, é o tipo de embalagem mais adequado para criopreservação do espermatozóide suíno.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de diferentes tipos de embalagens sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a qualidade espermática após a congelação e descongelação em diferentes embalagens;
- b) Avaliar a morfologia espermática do sêmen *in natura* e após a descongelação das diferentes embalagens;
- c) Analisar a qualidade espermática após o teste de termorresistência das amostras nas diferentes embalagens;
- d) Propor a melhor embalagem para seu uso em rotina de criopreservação do sêmen suíno.

MATERIAL E MÉTODOS

5.0. COLETA E ANÁLISE DO SÊMEN *IN NATURA*

5.1. Animais e coleta do sêmen:

Foram utilizados 5 animais adultos, pertencentes ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (FAVET/UECE), submetidos à rotina de coleta semanal. A coleta foi realizada pela técnica da mão enluvada, em manequim (figura 1) após lavagem do prepúcio com água tratada sendo enxugado com toalha de papel descartável. O sêmen foi coletado em frasco plástico com capacidade para 500 mL, previamente aquecido a 37 °C protegido por copo isotérmico. O ejaculado teve a fração gelatinosa separada por uma gaze especial, sendo posteriormente desprezada (figura 2). A qualidade do ejaculado (*in natura*) foi estabelecida quanto seu aspecto (branco marmóreo), volume (mL), concentração ($\times 10^6$ spz/mL), total de células ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5) e motilidade espermática (%). Foi utilizada uma ficha padrão para o acompanhamento do ejaculado de cada animal (ANEXOS II e III).

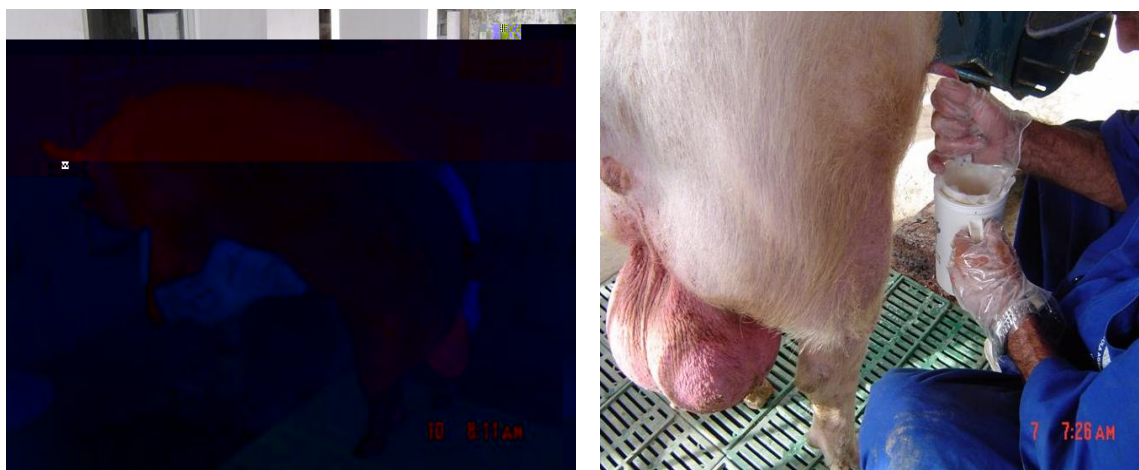


Figura 1 – Coleta do ejaculado pela técnica da mão enluvada. Animal sobre o manequim de acrílico.



Figura 2 - Retirada da gaze que retém a porção gel do ejaculado.

5.2. Análise do sêmen *in natura*:

5.2.1. Vigor e Motilidade

Para as análises do vigor e da motilidade espermática, foram utilizadas alíquotas de 15 μL do sêmen diluído, colocadas entre lâmina e lamínula para observação em microscopia óptica a um aumento de 200x. As análises foram realizadas após 10 minutos de incubação em banho-maria à 37 °C.

5.2.2. Taxa de degradação média da motilidade (TDM)

O teste utilizado para análises *in vitro* que mais se aproxima das condições naturais do sêmen após a inseminação é o teste de termorresistência. Este teste consiste na incubação do sêmen, após coleta em banho-maria a 37 °C, durante 2 horas. Aos resultados aplica-se uma fórmula matemática, no intuito de calcular a taxa de degradação média da motilidade (TDM). A TDM consiste em se calcular o vigor espermático aos 10 minutos de incubação subtraído do valor da mesma característica após 2 horas de incubação, dividido pelo mesmo valor aos 10 minutos. O resultado desta operação é multiplicado por 100, fornecendo então o

resultado final. A TDM é expressa em porcentagem (%) e calculada pela seguinte fórmula matemática:

$$\text{TDM} = \frac{\text{vigor 10 m} - \text{vigor 2 h}}{\text{vigor 10 m}} \times 100$$

5.2.3. Morfologia

Para análise morfológica dos espermatozoides, foi separada uma alíquota de 0,5 mL de sêmen e a esta foi adicionada 0,5 mL de solução formol-salina (0,99 mL de soro fisiológico e 0,01 mL de formol) e em seguida colocadas em tubos *ependorffes*. Em se tratando da palheta de 0,5 mL, foi descongelada uma segunda amostra para a avaliação desta característica. No caso das outras embalagens, o volume era suficiente para todas as características à serem avaliadas.

De cada ejaculado, para cada um dos tratamentos (diferentes embalagens), foi separada uma alíquota de 0,5 mL para ser realizada a análise morfológica. A morfologia foi analisada segundo à qualidade do acrossoma, sendo classificado em duas classes diferentes: espermatozoide com acrossoma intacto e espermatozoides com acrossoma danificado.

As análises foram realizadas no sêmen *in natura* e após a descongelação, em cada uma das diferentes embalagens, contando-se 200 células por amostra. Os exames foram realizados por meio da microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 1000x.

6.0. TÉCNICA DE CONGELAÇÃO

6.1. Técnica de Congelação do sêmen (Paquignon *et al.*, 1974):

Após a análise do sêmen *in natura*, este foi refrigerado, congelado e armazenado em diferentes tipos de embalagens (em palhetas de 0,5 mL, criotubos de 2,0 mL e macrotubos de 4,0 e 5,0 mL). O diluidor de resfriamento foi constituído por 5,67 g de glicose, 22,5 % de gema de ovo, e completados com água destilada até

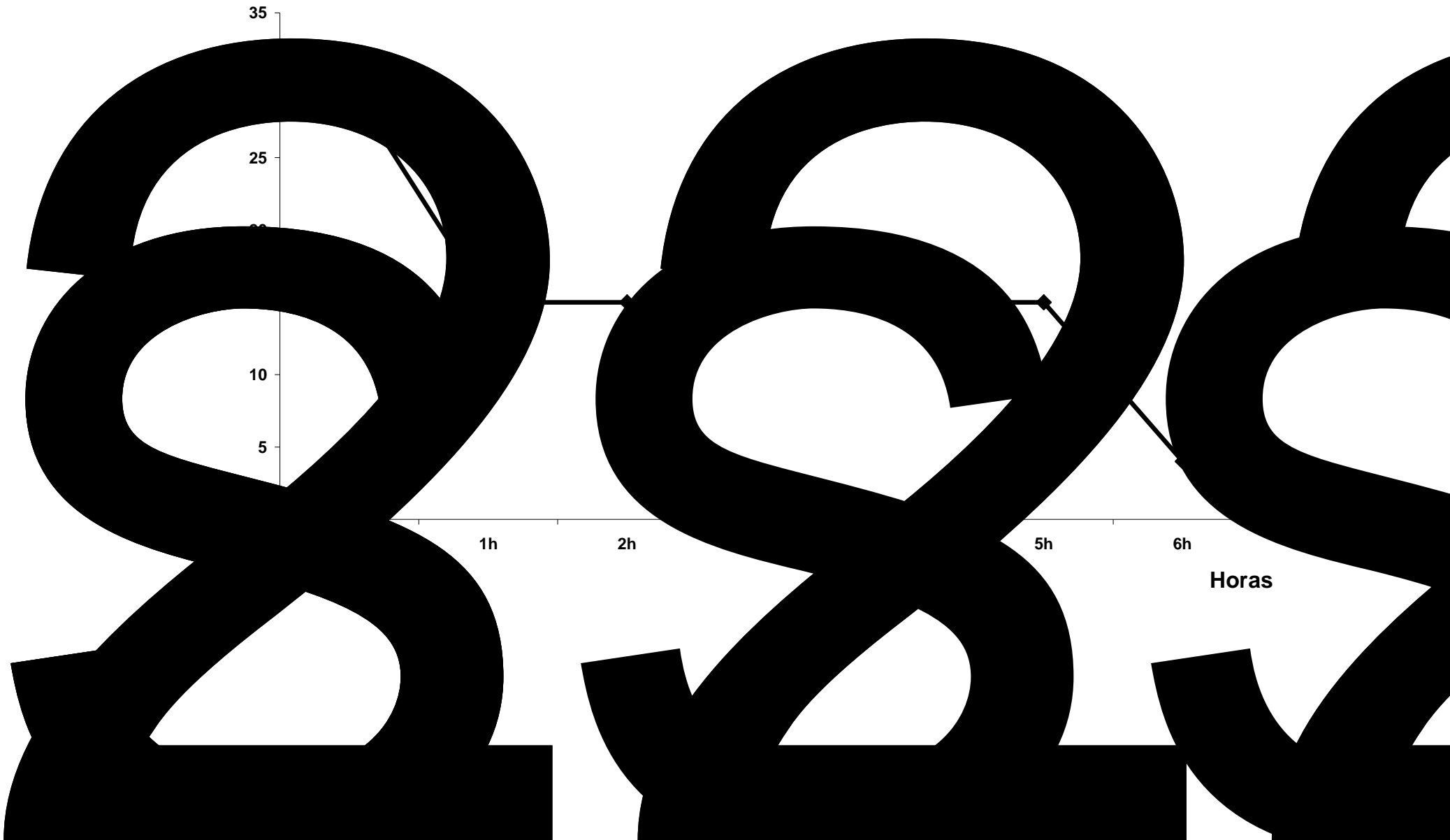
obtenção de um volume final de 100 mL. O diluidor de congelação é o mesmo do diluidor de resfriamento adicionado glicerol á 4%. A concentração final de glicerol para a congelação foi estabelecida em 2% (Polge *et al.*, 1970).

O plasma seminal foi eliminado do ejaculado logo após a sua coleta, através de centrifugação (30 °C) a 800g (2.600 rpm) por 15 minutos. O volume de plasma seminal separado do precipitado de espermatozóides através da centrifugação foi retirado por pipetagem, e armazenado em bisnagas plásticas com volume de 90 ml, congelado e conservado à -20 °C.

Após a centrifugação, foi feita uma 1ª diluição através da adição do diluidor de resfriamento previamente estabilizado a 30 °C: aproximadamente 2,0 ml de precipitado de espermatozóides + 9,0 mL do diluidor (módulos de 2 + 9 mL). Foi separado do ejaculado um total de $10,2 \times 10^9$ spz, em volumes variados de acordo com a concentração inicial do sêmen.

A partir deste ponto, a temperatura do módulo foi abaixada progressivamente (em 1 hora) até a temperatura de 17 °C e mantida a este nível durante 5 horas. Foi feita uma 2ª diluição (diluição final a 17 °C), adicionando-se a cada módulo mais 9,0 mL do diluidor de congelação (glicose/gema de ovo/glicerol a 4%), este, juntamente com a 1ª diluição foi obtida uma concentração final de glicerol a 2% (Polge *et al.*, 1970), independente do tipo da embalagem a ser testado. A figura 3 representa os momentos em que foram adicionados os diluidores de resfriamento e congelação.

Após a segunda diluição, ocorreu uma nova etapa de abaixamento de temperatura do módulo, durante 1 hora. Após este tempo foi alcançada a temperatura de 4 °C. O sêmen desta forma tratado foi armazenado em diferentes tipos de embalagem (Figura 3) colocadas deitadas lado a lado, em uma rampa de congelação a uma distância de 5,0 cm da superfície do nitrogênio líquido. Desta forma, cada embalagem permaneceu durante 10 minutos, sendo então, transferidos diretamente para o nitrogênio líquido onde ficaram mantidos por pelo menos 15 dias até então serem analisados e comparados cada tipo de embalagem ao sêmen *in natura*.



6.2. Embalagem do sêmen:

Após o resfriamento do sêmen até a temperatura de 4 °C, o mesmo proveniente de cada ejaculado foi envasado em diferentes tipos de embalagens (figura 4) com a finalidade de se testar a que se adapta melhor a técnica, proporcionando melhor qualidade espermática após a descongelação. Foram testadas as seguintes embalagens:

- 01) Palhetas com diâmetro de 0,2 cm e volume de 0,5 mL;
- 02) Criotubos com diâmetro de 10 cm e volume de 2,0 mL;
- 03) Macrotubos com diâmetro de 0,5 cm e volume de 4 mL (Mac 4);
- 04) Macrotubos com diâmetro de 0,5 cm de 5,0 ml (Mac 5).

A concentração espermática foi padronizada com $0,51 \times 10^6$ sptz/mL em todos os diferentes tipos de recipientes. Tanto as palhetas como os macrotubos foram vedados com esferas de vidro; já o criotubo foi vedado com uma tampa rosqueada adequada.

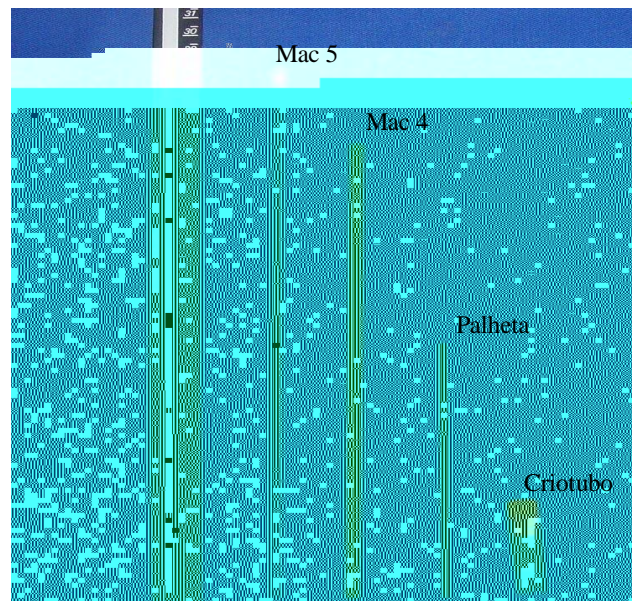


Figura 4 – Embalagens utilizadas no projeto (macrotubo de 5 mL, macrotubo de 4 mL, palheta de 0,5 mL e criotubo de 2 mL)

6.3. Congelação das amostras:

Após o envase do sêmen em cada uma das quatro embalagens (figura 5), estas foram submetidas ao vapor de nitrogênio a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sukhato *et al.*, 2001) durante 10 minutos em rampa de congelação (figura 6), à uma distância de 5 cm da superfície do nitrogênio líquido. Decorrido o tempo estabelecido, o sêmen foi depositado em canisteres numerados devidamente identificados e armazenados diretamente no nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 7), onde permaneceram por um período mínimo de 15 dias, até as análises.

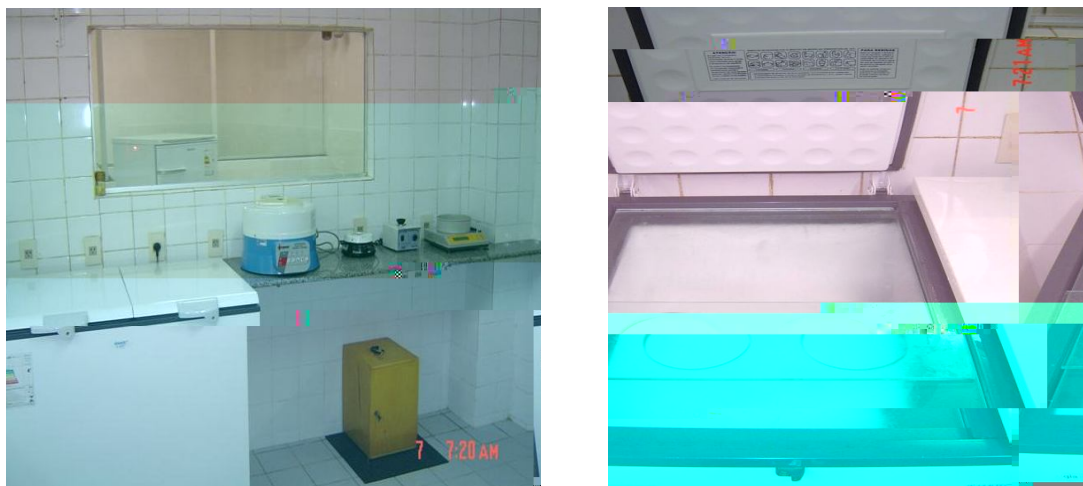


Figura 5 – Freezer utilizado para o envase das amostras. Temperatura interna de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

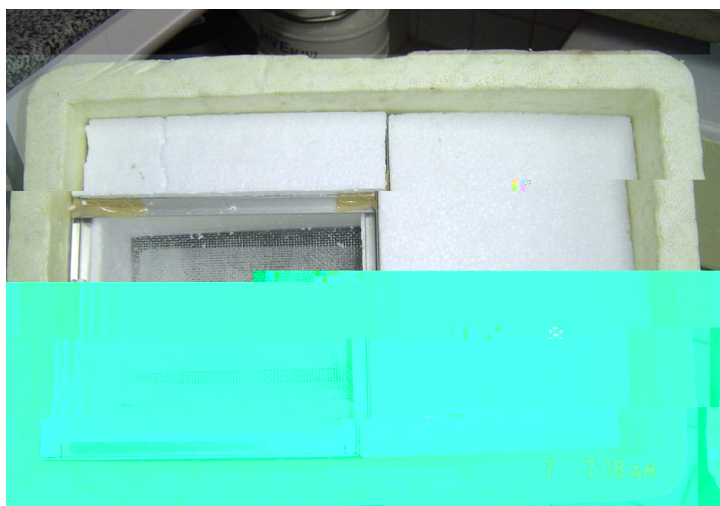


Figura 6 - Rampa de congelação.



Figura 7 – Armazenamento das amostras já congeladas em botijões de nitrogênio líquido.

7.0. DESCONGELAÇÃO E RESSUSPENSÃO

7.1. Descongelação e ressuspensão do sêmen:

Para a descongelação, foram testados diferentes tempos e temperaturas nos diferentes tipos de embalagem utilizados, conforme esquema a seguir:

- 01) Palhetas: 37 °C por 30 segundos;
- 02) Macrotubos e Criotubos: 50 °C por 40 segundos;

Imediatamente após a descongelação, cada amostra foi colocada em tubos plásticos contendo um termômetro para aferição da temperatura. A esta amostra foi adicionado o diluidor de ressuspensão (BTS – Betsville) estabilizado a 37 °C para então serem posteriormente analisadas. Para as análises *in vitro*, a diluição do sêmen descongelado no diluidor de ressuspensão foi feita adicionando-se um volume fixo de cada uma das diferentes embalagens (0,5 mL) a um total de 4,5 mL diluidor BTS.

8.0. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

8.1. Vigor e motilidade espermática:

Após a descongelação e ressuspensão do sêmen, cada amostra foi avaliada através do vigor espermático (notas de 0 a 5 – Toniolli, 1996 – ANEXO I) e da motilidade espermática (0 a 100%). O sêmen descongelado foi colocado em banho-maria a 37 °C e as análises foram realizadas após 10 minutos de incubação. Para estas características foi colocado um volume de 15 µL do sêmen, entre lâmina e lamínula, para análise à luz a microscopia óptica a um aumento de 200x.

8.2. Avaliação morfológica do espermatozóide:

De cada ejaculado, para cada tratamento, incluindo-se sêmen *in natura*, foram separados 0,5 mL de sêmen e adicionado a 0,5 mL de solução formol-salina, a fim de se proceder à sua análise morfológica.

A morfologia foi analisada apenas quanto às características do acrossoma, sendo classificados como intacto ou danificado. Para se proceder tais análises, foram colocadas alíquotas de 0,15 µL colocados entre lâmina e lamínula e então realizada a contagem de 200 células. Adição a tubos eppendorffes de um volume de 0,5 mL de sêmen e 0,5mL de solução formol-salina (0,99mL de soro fisiológico e 0,01mL de formol).

- a) Identificar a lâmina;
- b) 0,5 mL de sêmen + 0,5 mL de solução formol-salina;
- c) Homogeneizar;
- c) Analisar.

Foram contadas 200 células por amostra, com os exames realizados por da microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 1000x.

8.3. Momentos das análises:

Para as características vigor e motilidade, o sêmen foi avaliado nos seguintes momentos do processo:

- a) Sêmen *in natura*;
- b) Após a adição do diluidor de resfriamento a 30 °C;
- c) Antes da adição do diluidor de congelação após o período de 5 h à 17 °C;
- d) Antes do envase à 4 °C;
- e) Após 10 minutos da ressuspensão do sêmen descongelado.
- f) Após 2 horas a 37 °C

Para o item “a”, o sêmen foi analisado logo após a coleta; nos itens “b”, “c” e “d”, a análise foi feita após 10 minutos de incubação do sêmen a 37 °C em BTS; para o item “e” a análise foi realizada após a descongelação com acréscimo do diluidor de ressuspensão ; e no item “f”, foi aplicado o teste de termorresistência.

Para as análises morfológicas, os esfregaços foram feitos nos seguintes momentos:

- a) Sêmen *in natura*;
- b) Imediatamente após a descongelação.

9.0. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. A análise estatística foi processada através da avaliação das médias e desvios padrões, aos quais foi aplicado o teste de Mann-Withney, e o teste do Qui-quadrado para valores expressos em porcentagem. Todos os testes foram aplicados a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise das diferenças entre médias foi realizada através do teste ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, os resultados de medida da temperatura do sêmen, logo após a descongelação, foi de 36 °C nas palhetas e de 34 °C nas demais embalagens testadas. Provavelmente, esta diferença está relacionada com os diferentes diâmetros das embalagens, uma vez que a temperatura utilizada para descongelação, se distribui de maneira mais uniforme da periferia para o centro da amostra nas embalagens com diâmetros menores, quando comparadas àquelas com diâmetros maiores (Ericksson & Rodrigues-Martinez, 2002). Por outro lado, devem ser avaliadas novas combinações de tempo e temperatura, para a descongelação do sêmen envasado em embalagens de maior diâmetro (macrotubos e criotubos), de forma a se obter uma temperatura da amostra descongelada mais próxima possível de 37 °C, uma vez que todo o material que entra em contato com o sêmen descongelado bem como o diluidor de ressuspensão, encontravam-se à esta temperatura. Desta forma, problemas de choque térmico poderão ser evitados. Apesar do sêmen suíno ser altamente sensível, existe citação de análise espermática do sêmen *in natura*, em lâminas e lamínulas aquecidas a 38-39 °C (CBRA, 1998), o que daria uma diferença de até 4 °C uma vez que os ejaculados suínos em nosso clima apresentam temperaturas que variam entre 35 e 37 °C. Baseado nesta indicação da literatura, a diferença de temperatura entre o sêmen descongelado proveniente dos criotubos e macrotubos, e o diluidor de ressuspensão, não teria tido influência sobre os resultados de motilidade, o que indicaria a possibilidade de que a distribuição da temperatura durante a descongelação dentro da coluna de sêmen da periferia para o centro da embalagem (Ericksson & Rodrigues-Martinez, 2002), teria uma maior influência na qualidade do sêmen pós-descongelação, tornando-se assim um fator mais importante a ser considerada para a escolha de embalagens visando a congelação do sêmen do varrão.

Todo o material e diluidor que teve contato com as amostras descongeladas, encontravam-se à temperatura de 37 °C; já o sêmen proveniente das palhetas apresentou uma diferença de apenas 1 °C para o diluidor de ressuspensão, enquanto que nas outras embalagens, esta diferença chegou à 3 °C, o que pode ter

favorecido um choque térmico, que possivelmente justificaria os melhores resultados encontrados no sêmen armazenado nas palhetas. Por outro lado, resultados obtidos por Bamba & Cran (1985), mostraram que grandes diferenças de temperatura entre o sêmen suíno e o diluidor podem não apresentar influência imediata sobre a motilidade espermática, entretanto, quando da incubação do mesmo por até 5 horas, os valores caem significativamente em comparação às amostras onde não ocorreu diferença de temperatura entre o sêmen e o diluidor, este é um fator que deve ser melhor explorado e analisado a fim de se determinar exatamente a sua influência sobre os resultados de qualidade espermática após a descongelação.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com alguns achados da literatura, onde Eriksson & Rodrigues-Martinez (2000) medindo a temperatura do sêmen descongelado à 40 °C por 20 segundos, envasado em macrotubos (4 mL) e sacolas de PVC (5 mL), obtiveram melhores resultados de motilidade espermática nas amostras provenientes das sacolas de PVC. Apesar deste tipo de embalagem apresentar um volume alto (5 mL), quando comparado ao das palhetas de 0,5 mL utilizadas neste trabalho, resta salientar que a forma das sacolas de PVC era achatada, o que proporcionou uma distância entre as paredes da mesma mais próxima do diâmetro das palhetas do que dos criotubos ou macrotubos, explicando desta forma os melhores resultados conseguidos.

A diminuição da qualidade espermática suína, após os processos de congelação e descongelação, ainda é um problema constante encontrado nos diferentes protocolos utilizados com esta finalidade (Stornelli *et al.*, 2005). Segundo Watson (2000), os efeitos da criopreservação podem induzir danos irreversíveis e letais aos espermatozoides, sendo de grande importância o estudo dos numerosos danos provocados, associados aos defeitos na membrana e nas organelas, que acabam por afetar a integridade funcional das células (Bwanga *et al.*, 1991; Watson, 2000), reduzindo a capacidade fertilizante dos espermatozoides (Peña, *et al.*, 2006). A queda dos valores do vigor, motilidade e morfologia espermática, são vistos tanto no sêmen refrigerado, quanto no congelado. Entretanto, nesta última forma de conservação da célula espermática, a influência da técnica utilizada sobre os

valores destas características tem sido bem mais contundente (Stornelli *et al.*, 2005).

Esta ação do processo de criopreservação sobre o espermatozóide suíno, em relação aos seus valores iniciais *in natura*, pode ser visto na tabela 1. A média das características do semên *in natura* foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao sêmen criopreservado e descongelado (figura 1).

Tabela 1: Comparação entre as características de vigor, motilidade e morfologia espermática, avaliadas no sêmen *in natura*, em relação às amostras descongeladas, ressuspensas e incubadas por 10 minutos à 37 °C.

Característica	<i>In natura</i>	Palheta	Criotubo	Mac 4	Mac 5
Vigor (0 à 5)	4,5 ± 0,3 ^A	2,3 ± 0,8 ^B	1,4 ± 0,9 ^C	1,5 ± 0,7 ^C	1,3 ± 0,8 ^C
Motilidade (%)	89,9 ± 6,4 ^A	45,4 ± 22,7 ^B	26,6 ± 21,4 ^C	26,3 ± 15,4 ^C	26,9 ± 18,3 ^C
Morfologia (%)	89,9 ± 10,4 ^A	60,6 ± 18,5 ^B	53,6 ± 17,9 ^C	54,1 ± 19,4 ^C	52,9 ± 18,2 ^C

A, B, C: Letras diferentes entre colunas apresentam difer

Os resultados iguais ($p>0,05$), para esta característica analisada, entre os dois tipos de macrotubos, devem-se provavelmente ao fato deles apresentar em um mesmo diâmetro, fato este que possibilitou uma mesma velocidade de resfriamento, congelação e descongelação entre as células do bordo da coluna de sêmen dentro do macrotubo, em relação às células de posição mais central.

O diâmetro ainda maior do criotubo, não favoreceu a obtenção de valores maiores para o vigor espermático, mas também não prejudicou esta característica avaliada em relação aos resultados obtidos nos macrotubos ($p>0,05$). Aparentemente os diferentes volumes e altura dos frascos não interferiram nos resultados obtidos.

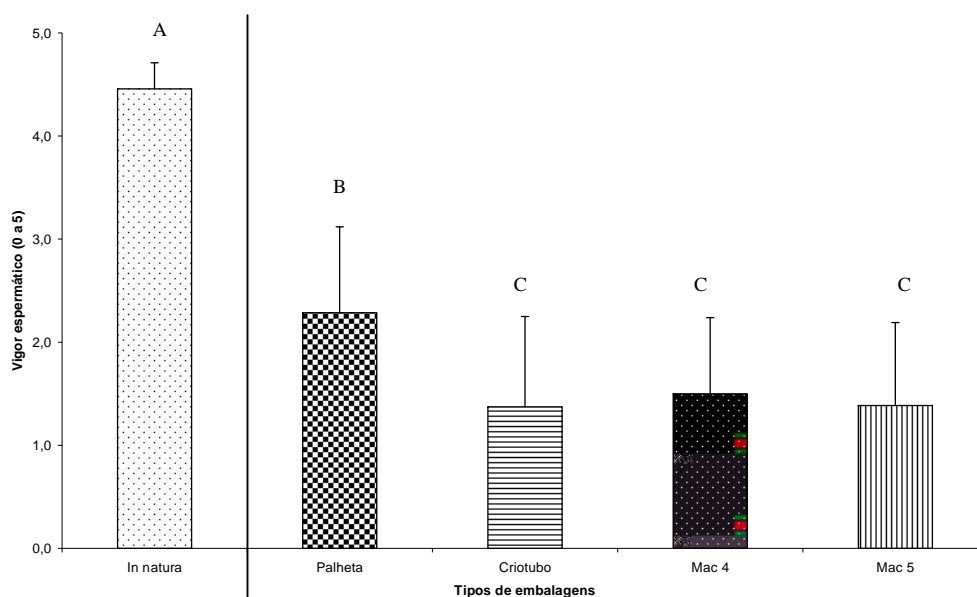


Figura 8: Análise do vigor espermático do sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens, sob a forma *in natura* e após descongelação e incubação à 37 °C em banho-maria.

Quando comparados os resultados obtidos após a descongelação em relação ao sêmen *in natura*, a queda dos valores do vigor espermático foi significativamente diferente em todos os tratamentos. Esta queda em amostras de sêmen que sofrem processos de abaixamento de temperatura (resfriamento e congelação), é um fato

comprovado por diversos trabalhos uma vez que o processo de criopreservação provoca danos funcionais e estruturais aos espermatozoides refletindo numa redução na qualidade espermática após todo processo. (Holt, 2000; Oehninger *et al.*, 2000). Entretanto, quando submetidos aos protocolos de congelação, esta queda avaliada no sêmen após descongelação e posterior reaquecimento, é maior. Neste trabalho, esta queda foi mais acentuada no sêmen proveniente das embalagens com maior diâmetro (Criotubo, Mac 4 e Mac 5) em relação à de menor diâmetro (palheta) ($p < 0,05$).

Em relação à característica motilidade espermática, os resultados mostraram-se semelhantes àqueles observados com o vigor espermático. De acordo com a figura 9 as amostras acondicionadas em palhetas apresentaram maiores percentuais de motilidade espermática em relação às outras embalagens. Entre os criotubos e macrotubos de 4 e 5 mL não houve diferenças estatisticamente significativas.

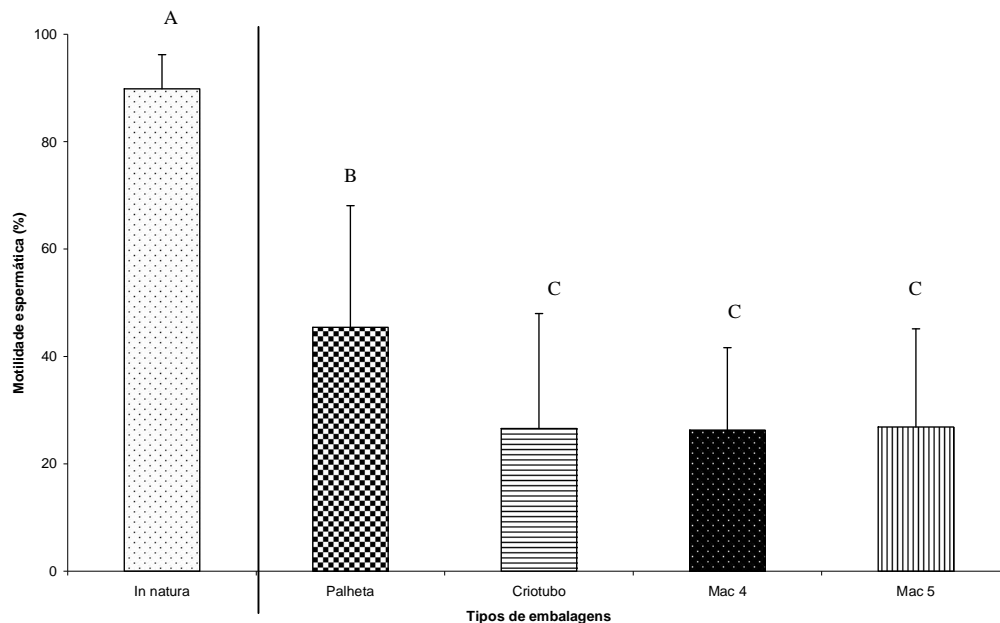


Figura 9: Análise da motilidade espermática do sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens, sob a forma *in natura* e após descongelação e incubação à 37 °C em banho-maria.

O teste de termorresistência tem por finalidade avaliar *in vitro*, a diminuição do vigor espermático durante um período de 2 horas de incubação do sêmen à 37 °C. Segundo este teste, em todas as embalagens utilizadas houve uma redução nos valores do vigor espermático após a incubação, esta redução também foi observada em carneiros (Josh, *et al.*, 2005). Os resultados deste teste podem ser vistos na figura 3, onde houve uma redução de 56,5% nas palhetas, 71,4% no criotubo, 73,3% no macrotubo de 4 mL e 69,2% no macrotubo de 5 mL. Percebeu-se que o sêmen envasado e congelado nas palhetas, apresentou o melhor resultado para este tipo de teste, uma vez que o mesmo simula *in vitro* o que aconteceria com o sêmen após ser depositado no genital da fêmea. Desta forma, pode-se dizer que a palheta é a embalagem que proporciona ao espermatozóide suíno após descongelação uma melhor possibilidade de fertilização, uma vez que o sêmen nela congelado preserva uma maior quantidade de células com boa motilidade.

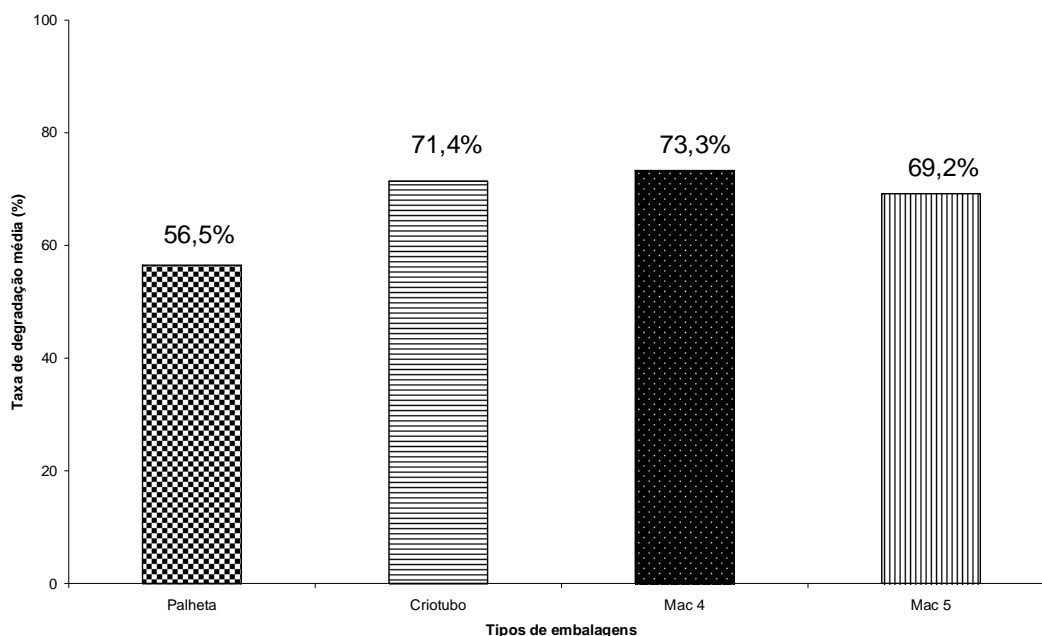


Figura 10: Avaliação da taxa de degradação média (TDM), após o teste de termorresistência nos diferentes tipos de embalagem para o sêmen suíno.

Na análise morfológica foram avaliados os números de acrossomas intactos e danificados após a descongelação. A figura 11 representa a freqüência de

espermatozoides que apresentam acrossoma intacto em cada uma das embalagens testadas. As palhetas apresentaram maior percentagem de espermatozoides com acrossomas intactos em comparação com os demais tipos de embalagem ($p < 0,05$).

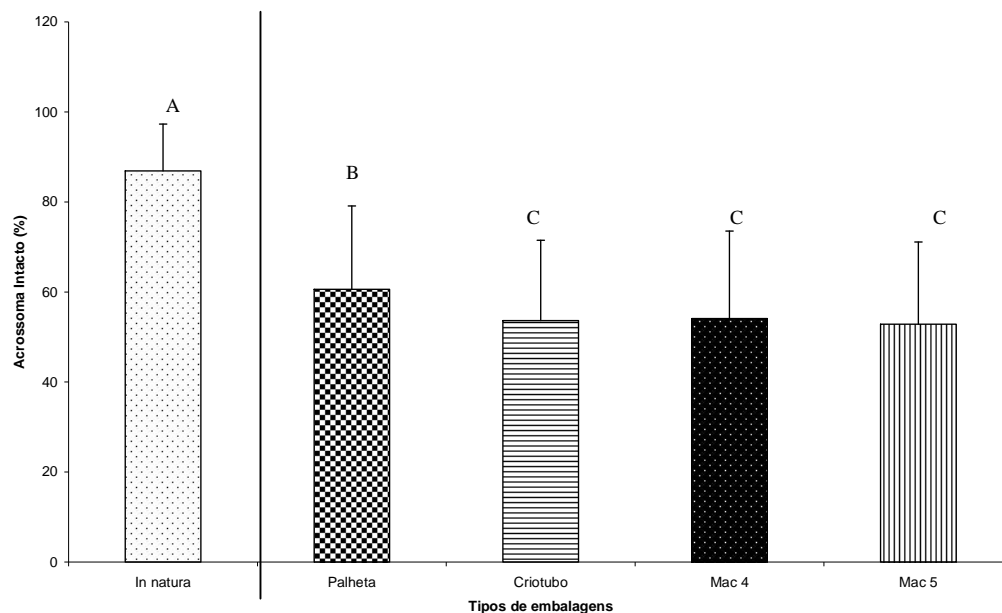


Figura 11: Análise da morfologia espermática do sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens, sob a forma *in natura* e após descongelação e incubação à 37 °C em banho-maria.

Mais uma vez, para a característica morfologia espermática, as diferenças entre o sêmen *in natura* e o criopreservado foram significativas ($p < 0,05$). Entretanto, viu-se uma maior queda do número de células com acrossoma intacto, no sêmen proveniente das embalagens com maior diâmetro (Criotubo; Mac 4 e Mac 5) ($p < 0,05$).

O tipo de embalagem utilizada na criopreservação do sêmen suíno, parece realmente interferir na qualidade espermática avaliada após descongelação, sendo a distância do raio das mesmas, um detalhe a ser considerado como um dos fatores que pode estar relacionado a esta interferência. Córdova *et al.*, (2000) e Izquierdo *et al.*, (2005), propuseram que a forma e o volume do recipiente poderiam influenciar na qualidade do sêmen congelado. O choque térmico entre as células que se

encontram nas regiões periféricas e centrais da embalagem, pode induzir ao aparecimento de danos no acrossoma dos espermatozoides durante o processo de criopreservação. Levando-se em consideração as afirmativas dos autores supra citados, juntamente com os resultados de Eriksson & Rodrigues-Martinez (2000), verificou-se que os resultados deste trabalho apresentaram uma tendência parcial quando comparados aos destes autores, no que diz respeito ao formato das embalagens testadas.

Com relação ao volume, inicialmente pensou-se na possibilidade de sua influência sobre a qualidade do sêmen descongelado, entretanto, levando-se em consideração os resultados obtidos por Eriksson & Rodrigues-Martinez (2000), com o uso das bolsa de PVC (5 mL), percebeu-se que esta característica seria de menor relevância para a compreensão dos fatores que realmente poderiam estar influenciando na qualidade espermática pós descongelação. Este fato foi confirmado pelos resultados deste trabalho, uma vez que, comparando-se as maiores embalagens com volumes diferentes (criotubo = 2 mL; macrotubos = 4 e 5 mL), não houve diferença significativas ($p > 0,05$) para as características avaliadas (vigor, motilidade e morfologia espermática).

A opção para se utilizar um determinado tipo de embalagem, deve ser vinculada à facilidade de manejo, ao custo e aos resultados de congelação/descongelação. Para serem adequadas, elas devem propiciar velocidades de congelação e descongelação uniformes (Hofmo & Almlid, 1991), sendo sugerido para isto uma maior relação superfície:volume. Neste sentido, vários trabalhos resultaram na obtenção de uma melhor qualidade espermática após descongelação, quando foram usados macrotubos achatados (1,7 ml) ou palhetas de 0,5 ou 0,25 ml, em comparação aos macrotubos tradicionais (5 mL) (Fazano, 1986; Bwanga *et al.*, 1991).

A velocidade de descongelação do centro da dose, mantida em macrotubos é 3,7 vezes menor do que a observada na periferia, mas esta variação não ocorre nas doses congeladas em macrotubos achatados (Weitze *et al.*, 1991), o que poderia explicar os melhores resultados com estes últimos. Eriksson & Rodríguez-Manínez (2000) também atribuem os melhores resultados de motilidade das amostras congeladas em bolsas com capacidade para 5 mL, em comparação aos macrotubos, à maior velocidade de descongelação. Neste trabalho

observou-se que as amostras congeladas em embalagens com diâmetros menores colaboram com a teoria de que o diâmetro tem influência direta na qualidade das células descongeladas embora não tenha se observado a influência do diâmetro quando comparados os criotubos e os macrotubos de 4 e 5 mL. Este resultado também está de acordo com a literatura já que a partir de um determinado diâmetro ainda não estabelecido, as amostras contidas em embalagens com tais características não proporcionam a distribuição homogênea da temperatura não apresentando desta forma diferenças significativas.

Na tentativa de se fazer uma projeção dos resultados deste trabalho, correlacionando-os com a possibilidade de fertilização dos espermatozoides suínos criopreservados em diferentes tipos embalagens, faz-se necessário considerar informações obtidas na literatura que indicam da mesma forma, melhores resultados de motilidade e morfologia espermática obtidos em embalagens de menor diâmetro (Izquierdo *et al.*, 2005; Eriksson & Rodriguez-Martínez, 2002; Wevar *et al.*, 1997), o que não significa obrigatoriamente maiores porcentagens de fêmeas gestantes inseminadas com sêmen proveniente de congelação em palhetas.

CONCLUSÕES

O diâmetro da embalagem influencia na qualidade das células espermáticas descongeladas;

Embalagens que apresentam menor diâmetro permitem uma redução da diferença de temperatura entre as células da porção periférica e central da amostra;

A embalagem mais adequada para uma melhor conservação do sêmen suíno é aquela que possibilita uma congelação mais uniforme da amostra de sêmen contida no seu interior, no caso, a palheta de 0,5 mL.

A influência destes resultados *in vitro* sobre a possibilidade de fertilização dos espermatozóides criopreservados, deve ser confirmado em experimentos *in vivo*.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a necessidade e a importância de mais estudos utilizando embalagens diferentes que acomodem um maior volume de células e conseqüentemente que uma única embalagem tenha capacidade de armazenar uma dose inseminante além de recuperar uma quantidade aceitável de células viáveis por dose.

A realização de novas pesquisas sobre diferentes embalagens auxiliaria na implementação da melhoria nas técnicas para o protocolo de criopreservação de células espermáticas suínas.

ARTIGO ANEXO**Submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
Avaliação de diferentes tipos de embalagens sobre a qualidade do sêmen
suíno criopreservado**

(The diferents packings evaluation on the swine semen freezing quality)

Araújo, D.O.*, Albuquerque, A.C.C., Toniolli, R

Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen – Universidade Estadual do Ceará.

Fortaleza – Ceará. 2. Universidade Federal do ceará – UFC.

* Danielle Oliveira de Araújo, e-mail: danioara@hotmail.com. Rua Maranhão, 235 – Neópolis. Natal
– Rio Grande do Norte.

ABSTRACT

Due to the high sensibility of the swine spermatozoid to the cryopreserved process, it becomes important the study concerning the provoked damages the cell, for the thermal aggression caused during the process. The influence of types of used packings was evaluated, for the storage of swine semen, about the quality of the spermatozoid cryopreserved. Hybrid animals of Reprodução Suína's Labo

pela agressão térmica ocasionada durante este processo. Neste trabalho foi avaliada a influência de diferentes tipos de embalagens utilizadas, para o armazenamento de sêmen suíno, sobre a qualidade do espermatozóide criopreservado. Foram utilizados animais híbridos do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do sêmen (LRSTS) da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. A coleta foi feita pela técnica da mão enluvada. Foram analisados o vigor (0 a 5), a motilidade (0 a 100%) e a morfologia espermática. O sêmen foi congelado em palhetas de 0,5 mL, criotubos de 2,0 mL e macrotubos de 4 e 5 mL. As amostras de sêmen suíno congelado em palhetas, apresentaram os melhores resultados com diferença estatisticamente significativas quando comparadas às amostras criopreservadas nos outros três tipos de embalagens avaliadas. Os resultados pós descongelação indicaram que o sêmen envasado nas palhetas foi o que apresentou características condizentes com a possibilidade de serem utilizados nos protocolos de inseminação artificial com possibilidades de bons resultados de fertilidade. Conclui-se que embalagens que permitam uma maior velocidade de trocas de temperatura entre as células encontradas no bordo e no centro das mesmas, favorecem a uma melhor qualidade do sêmen descongelado.

I. INTRODUÇÃO

Diferentes protocolos de congelação do sêmen suíno vêm sendo estudados há vários anos, na tentativa de se aprimorar a técnica de criopreservação (Córdova, *et al.*, 2002). Durante este processo, diversos fatores devem ser levados em consideração tais como, a complexidade bioquímica do espermatozóide, a interação de seus componentes e a influência do resfriamento, congelação e descongelação (Parks & Graham, 1992). De acordo com esta problemática deve-se dar atenção também à embalagem do sêmen. Existem vários tipos de materiais empregados para o armazenamento do sêmen, tais como: ampolas ou tubos de vidro. A congelação sob a forma de pellets também é utilizada, entretanto, devido às limitações de armazenamento e manipulação dos pellets, além dos riscos de ordem sanitária para a amostra de sêmen, este método não tem sido empregado. Vários estudos têm sido efetuados a fim de se encontrar embalagens adequadas para a congelação do sêmen suíno. As embalagens adequadas devem propiciar velocidades de congelação e descongelação uniformes (Hofmo & Almlid, 1991), sendo sugerida as que proporcionem uma maior relação superfície/volume. Diante do

acima exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes tipos de embalagens sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 5 reprodutores (2 Dallands, 1 Landrace, 1 Duroc e 1 Sighers) do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen (LRSTS) da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, submetidos a uma rotina semanal de coleta de sêmen.

As coletas foram realizadas pela técnica da mão enluvada em manequim, após lavagem do prepúcio com água corrente e secagem com papel toalha descartável. O sêmen foi coletado em frasco plástico com capacidade para 500 mL, previamente aquecido a 37 °C protegido por copo isotérmico. A fração gelatinosa do ejaculado foi separada por gaze especial, sendo posteriormente desprezada.

1.0. Análise do sêmen *in natura*

A qualidade do ejaculado *in natura* foi estabelecida através do volume (mL), da concentração ($\times 10^9$ sptz/mL), do total de células ($\times 10^9$ sptz), do vigor espermático (escores de 0 a 5; Toniolli, 1996), da motilidade espermática (0 a 100%) e morfologia espermática. Para a análise do vigor e da motilidade, uma amostra do sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula e processada a leitura em microscopia óptica com um aumento de 200 vezes. Pelo menos três campos do microscópio foram analisados para obtenção de uma média da avaliação.

Foram criopreservados somente os ejaculados que apresentaram no mínimo, as seguintes características: vigor = 3,5 e motilidade = 80%. De cada ejaculado foi retirado um total de 102×10^6 sptz para cada tratamento de congelação do sêmen.

2.0. Congelação e envase do sêmen

Para a congelação do sêmen, utilizou-se a técnica de Paquignon *et al.* (1974). Sendo selecionadas para o armazenamento do sêmen, as seguintes embalagens:

a) Palhetas com volume de 0,5 mL; b) Criotubos com volume de 2,0 mL; c) Macrotubos de 240 mm com volume de 4 mL (Mac 4); d) Macrotubos de 280 mm com volume de 5,0 mL (Mac 5)

A concentração espermática foi padronizada em $0,51 \times 10^9$ spz/mL em todos os diferentes tipos de embalagens. Tanto as palhetas como os macrotubos foram vedados com esferas de vidro e os criotubos com uma tampa rosqueada apropriada.

Após o envase do sêmen em cada uma das quatro embalagens, elas foram submetidas aos vapores de nitrogênio -120 °C (Sukato *et al.*, 2001) durante 10 minutos em rampa de congelação, a uma distância de 5 cm da superfície do líquido. Decorrido o tempo estabelecido, as amostras congeladas e devidamente identificadas foram depositadas em canisteres numerados e mergulhadas diretamente no nitrogênio líquido dentro do botijão (-196 °C), onde permaneceram por um período mínimo de 15 dias, para posterior descongelação e análises.

3.0. Descongelação e ressuspensão do sêmen

Para descongelação das amostras, foi utilizado um descongelador automático (Geysir, Minitub GmbH) sendo estabelecidos tempos e temperaturas diferentes para cada tipo de embalagem, conforme esquema a seguir:

a) Palhetas: 37 °C por 30 segundos; b) Macrotubos e Criotubos: 50 °C por 60 segundos.

Após a descongelação foi retirada uma alíquota de 0,5 mL da amostra de cada embalagem e colocadas em tubos de ensaio previamente aquecidos 37 °C adicionando-se 4,5 mL do diluidor de ressuspensão (Diluidor de Beltsville – BTS) também aquecido a 37 °C. Imediatamente após a descongelação, e antes da ressuspensão, o sêmen colocado no tubo de ensaio, foi medida a temperatura da amostra, colocando-se um termômetro ao volume do sêmen descongelado.

4.0. Análises *in vitro*

4.1. Vigor e Motilidade

Para as análises do vigor e da motilidade espermática, foram utilizadas alíquotas de 15 μ L do sêmen diluído, colocadas entre lâmina e lamínula para observação em

microscopia óptica a um aumento de 200x. As análises foram realizadas após 10 minutos de incubação em banho-maria à 37 °C.

4.2. Taxa de degradação média da motilidade (TDM)

Dentre eles, um dos que mais se aproxima das condições naturais do sêmen após a inseminação é o que trata do teste de termorresistência. Este teste consiste na incubação do sêmen, após coleta em banho-maria à 37 °C, durante 2 horas. Aos resultados aplica-se uma fórmula matemática, no intuito de calcular a taxa de degradação média da motilidade (TDM). A TDM consiste em se calcular o vigor espermático aos 10 minutos de incubação subtraído do valor da mesma característica após 2 horas de incubação, dividido pelo mesmo valor aos 10 minutos. O resultado desta operação é multiplicado por 100 fornecendo então o resultado final (TDM) expresso em porcentagem (%). A TDM é expressa pela seguinte fórmula matemática:

$$\text{TDM} = \frac{\text{vigor 10 m} - \text{vigor 2 h}}{\text{vigor 10 m}} \times 100$$

4.3. Morfologia

Para análise morfológica dos espermatozóides, foi separada uma alíquota de 0,5 mL de sêmen e a esta foi adicionada 0,5 mL de solução formol-salina (0,99 mL de soro fisiológico e 0,01 mL de formol) e em seguida colocadas em tubos *ependorffes*. Em se tratando da palheta de 0,5 mL, foi descongelada uma segunda amostra para a avaliação desta característica. No caso das outras embalagens, o volume era suficiente para todas as características à serem avaliadas.

De cada ejaculado, para cada um dos tratamentos (diferentes embalagens), foi separada uma alíquota de 0,5 mL para ser realizada a análise morfológica. A morfologia foi analisada segundo à qualidade do acrossoma, sendo classificado em duas classes diferentes: espermatozóide com acrossoma intacto e espermatozóides com acrossoma danificado.

As análises foram feitas no sêmen *in natura* e após a descongelação, em cada uma das diferentes embalagens, contando-se 200 células por amostra. Os exames foram realizados por meio da microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 1000x.

5.0. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. A análise estatística foi processada através da avaliação das médias e desvios padrões, aos quais foi aplicado o teste de Mann-Witney, e o teste do Qui-quadrado para valores expressos em porcentagem. Todos os testes foram aplicados à um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise das diferenças entre médias foi realizada através do teste ANOVA.

III. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, os resultados de medida da temperatura do sêmen, logo após a descongelação, foi de 36 °C nas palhetas e de 34 °C nas demais embalagens testadas. Provavelmente, esta diferença está relacionada com os diferentes diâmetros das embalagens, uma vez que a temperatura utilizada para descongelação, se distribui de maneira mais uniforme da periferia para o centro da amostra nas embalagens com diâmetros menores, quando comparadas àquelas com diâmetros maiores (Ericksson & Rodrigues-Martinez, 2002). Por outro lado, devem ser avaliadas novas combinações de tempo e temperatura, para a descongelação do sêmen envasado em embalagens de maior diâmetro (macrotubos e criotubos), de forma a se obter uma temperatura da amostra descongelada mais próxima possível de 37 °C, uma vez que todo o material que entra em contato com o sêmen descongelado bem como o diluidor de ressuspensão, encontravam-se à esta temperatura. Desta forma, problemas de choque térmico poderão ser evitados. Apesar do sêmen suíno ser altamente sensível, existe citação de análise espermática do sêmen *in natura*, em lâminas e lamínulas aquecidas a 38-39 °C (CBRA, 1998), o que daria uma diferença de até 4 °C uma vez que os ejaculados suínos em nosso clima apresentam temperaturas que variam entre 35 e 37 °C. Baseado nesta indicação da literatura, a diferença de temperatura entre o sêmen descongelado proveniente dos criotubos e macrotubos, e o diluidor de ressuspensão, não teria tido influência sobre os resultados de motilidade, o que indicaria a possibilidade de que a distribuição da temperatura durante a descongelação dentro da coluna de sêmen da periferia para o centro da embalagem

(Ericksson & Rodrigues-Martinez, 2002), teria uma maior influência na qualidade do sêmen pós-descongelamento, tornando-se assim um fator mais importante a ser considerada para a escolha de embalagens visando a congelamento do sêmen do varrão.

Todo o material e diluidor que teve contato com as amostras descongeladas, encontravam-se à temperatura de 37 °C; já o sêmen proveniente das palhetas apresentou uma diferença de apenas 1 °C para o diluidor de ressuspensão, enquanto que nas outras embalagens, esta diferença chegou à 3 °C, o que pode ter favorecido um choque térmico, que possivelmente justificaria os melhores resultados encontrados no sêmen armazenado nas palhetas. Por outro lado, resultados obtidos por Bamba & Cran (1985), mostraram que grandes diferenças de temperatura entre o sêmen suíno e o diluidor podem não apresentar influência imediata sobre a motilidade espermática, entretanto, quando da incubação do mesmo por até 5 horas, os valores caem significativamente em comparação às amostras onde não ocorreu diferença de temperatura entre o sêmen e o diluidor, este é um fator que deve ser melhor explorado e analisado a fim de se determinar exatamente a sua influência sobre os resultados de qualidade espermática após a descongelamento.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com alguns achados da literatura, onde Eriksson & Rodrigues-Martinez (2000) medindo a temperatura do sêmen descongelado à 40 °C por 20 segundos, envasado em macrotubos (4 mL) e sacolas de PVC (5 mL), obtiveram melhores resultados de motilidade espermática nas amostras provenientes das sacolas de PVC. Apesar deste tipo de embalagem apresentar um volume alto (5 mL), quando comparado ao das palhetas de 0,5 mL utilizadas neste trabalho, resta salientar que a forma das sacolas de PVC era achatada, o que proporcionou uma distância entre as paredes da mesma mais próxima do diâmetro das palhetas do que dos criotubos ou macrotubos, explicando desta forma os melhores resultados conseguidos.

A diminuição da qualidade espermática suína, após os processos de congelamento e descongelamento, ainda é um problema constante encontrado nos diferentes protocolos utilizados com esta finalidade (Stornelli *et al.*, 2005). Segundo

Watson (2000), os efeitos da criopreservação podem induzir danos irreversíveis e letais aos espermatozoides, sendo de grande importância o estudo dos numerosos danos provocados, associados aos defeitos na membrana e nas organelas, que acabam por afetar a integridade funcional das células (Bwanga *et al.*, 1991; Watson, 2000), reduzindo a capacidade fertilizante dos espermatozoides (Peña, *et al.*, 2006). A queda dos valores do vigor, motilidade e morfologia espermática, são vistos tanto no sêmen refrigerado, quanto no congelado. Entretanto, nesta última forma de conservação da célula espermática, a influência da técnica utilizada sobre os valores destas características tem sido bem mais contundente (Stornelli *et al.*, 2005).

Esta ação do processo de criopreservação sobre o espermatozoide suíno, em relação aos seus valores iniciais *in natura*, pode ser visto na tabela 1. A média das características do semêm *in natura* foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao sêmen criopreservado e descongelado (figura 1).

Tabela 1: Comparação entre as características de vigor, motilidade e morfologia espermática, avaliadas no sêmen *in natura*, em relação às amostras descongeladas, ressuspensas e incubadas por 10 minutos à 37 °C.

Característica	<i>In natura</i>	Palheta	Criotubo	Mac 4	Mac 5
Vigor (0 à 5)	4,5 ± 0,3	2,3 ± 0,8	1,4 ± 0,9	1,5 ± 0,7	1,3 ± 0,8
Motilidade (%)	89,9 ± 6,4	45,4 ± 22,7	26,6 ± 21,4	26,3 ± 15,4	26,9 ± 18,3
Morfologia (%)	89,9 ± 10,4	60,6 ± 18,5	53,6 ± 17,9	54,1 ± 19,4	52,9 ± 18,2

Analisando-se os resultados do vigor espermático do sêmen descongelado (2,3), nas diferentes embalagens testadas, percebeu-se que os maiores valores foram encontrados no sêmen descongelado proveniente das palhetas. Tais resultados foram significativamente melhores ($p < 0,05$) quando comparados às outras três embalagens (1,4; 1,5 e 1,3) para criotubo, macrotubo de 4 mL e macrotubo de 5 mL, respectivamente (figura 1). Os espermatozoides criopreservados nos criotubos e nos macrotubos (4 e 5 mL), não apresentaram diferenças significativas entre si quando analisado o vigor espermático ($p > 0,05$).

Os resultados iguais ($p > 0,05$), para esta característica analisada, entre os dois tipos de macrotubos, devem-se provavelmente ao fato deles apresentar em um mesmo diâmetro, fato este que possibilitou uma mesma velocidade de resfriamento, congelação e descongelação entre as células do bordo da coluna de sêmen dentro do macrotubo, em relação às células de posição mais central.

O diâmetro ainda maior do criotubo, não favoreceu a obtenção de valores maiores para o vigor espermático, mas também não prejudicou esta característica avaliada em relação aos resultados obtidos nos macrotubos ($p > 0,05$). Aparentemente os diferentes volumes e altura dos frascos não interferiram nos resultados obtidos.

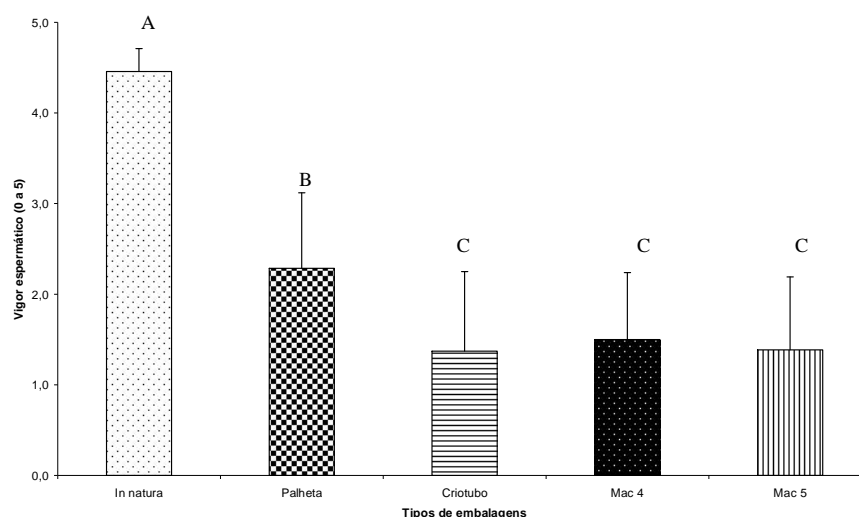


Figura 1: Análise do vigor espermático do sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens, sob a forma *in natura* e após descongelação e incubação à 37 °C em banho-maria.

Quando comparados os resultados obtidos após a descongelação em relação ao sêmen *in natura*, a queda dos valores do vigor espermático foi significativamente diferente em todos os tratamentos. Esta queda em amostras de sêmen que sofrem processos de abaixamento de temperatura (resfriamento e congelação), é um fato comprovado por diversos trabalhos uma vez que o processo de criopreservação provoca danos funcionais e estruturais aos espermatozoides refletindo numa redução na qualidade espermática após todo processo. (Holt, 2000; Oehninger *et al.*, 2000). Entretanto, quando submetidos aos protocolos de congelação, esta queda avaliada no sêmen após descongelação e posterior reaquecimento, é maior. Neste trabalho, esta queda foi mais acentuada no sêmen proveniente das embalagens com maior diâmetro (Criotubo, Mac 4 e Mac 5) em relação à de menor diâmetro (palheta) ($p < 0,05$).

Em relação à característica motilidade espermática, os resultados mostraram-se semelhantes àqueles observados com o vigor espermático. De acordo com a figura 2 as amostras acondicionadas em palhetas apresentaram maiores percentuais de motilidade espermática em relação às outras embalagens. Entre os criotubos e macrotubos de 4 e 5 mL não houve diferenças estatisticamente significativas.

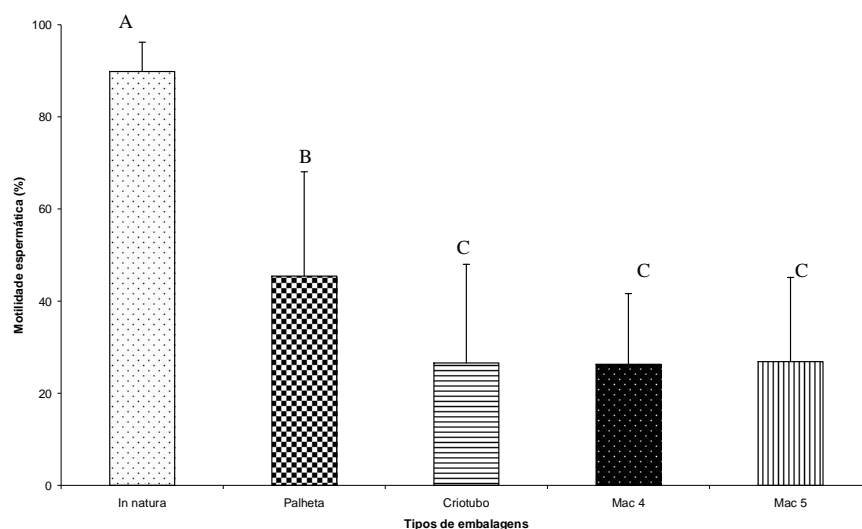


Figura 2: Análise da motilidade espermática do sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens, sob a forma *in natura* e após descongelação e incubação à 37 °C em banho-maria.

O teste de termorresistência tem por finalidade avaliar *in vitro*, a diminuição do vigor espermático durante um período de 2 horas de incubação do sêmen à 37 °C. Segundo este teste, em todas as embalagens utilizadas houve uma redução nos valores do vigor espermático após a incubação, esta redução também foi observada em carneiros (Josh, *et al.*, 2005). Os resultados deste teste podem ser vistos na figura 3, onde houve uma redução de 56,5% nas palhetas, 71,4% no criotubo, 73,3% no macrotubo de 4 mL e 69,2% no macrotubo de 5 mL. Percebeu-se que o sêmen envasado e congelado nas palhetas, apresentou o melhor resultado para este tipo de teste, uma vez que o mesmo simula *in vitro* o que aconteceria com o sêmen após ser depositado no genital da fêmea. Desta forma, pode-se dizer que a palheta é a embalagem que proporciona ao espermatozóide suíno após descongelação uma melhor possibilidade de fertilização, uma vez que o sêmen nela congelado preserva uma maior quantidade de células com boa motilidade.

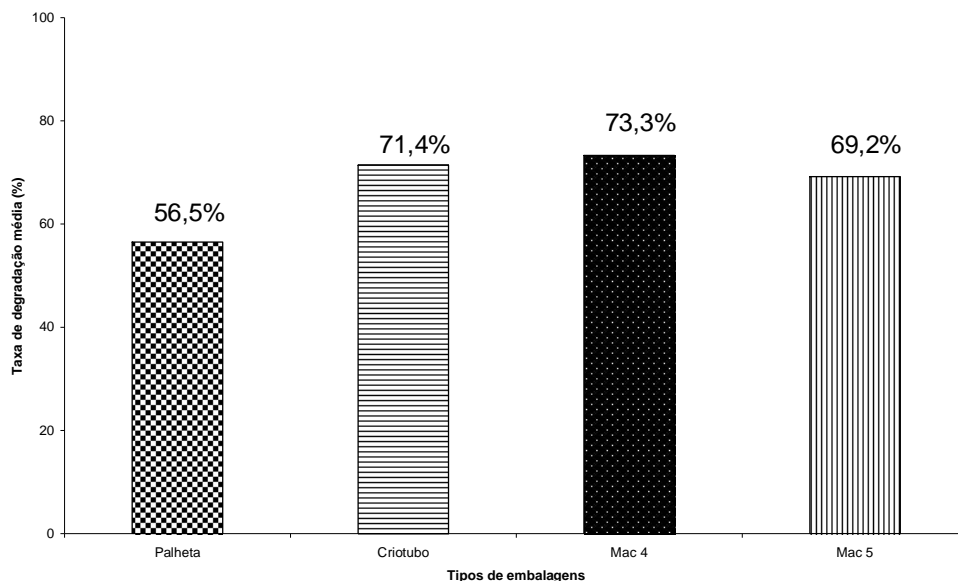


Figura 3: Avaliação da taxa de degradação média (TDM), após o teste de termorresistência nos diferentes tipos de embalagem para o sêmen suíno.

Na análise morfológica foram avaliados os números de acrossomas intactos e danificados após a descongelação. A figura 4 representa a freqüência de espermatozóides que apresentam acrossoma intacto em cada uma das embalagens

testadas. As palhetas apresentaram maior percentagem de espermatozoides com acrossomas intactos em comparação com os demais tipos de embalagem ($p < 0,05$).

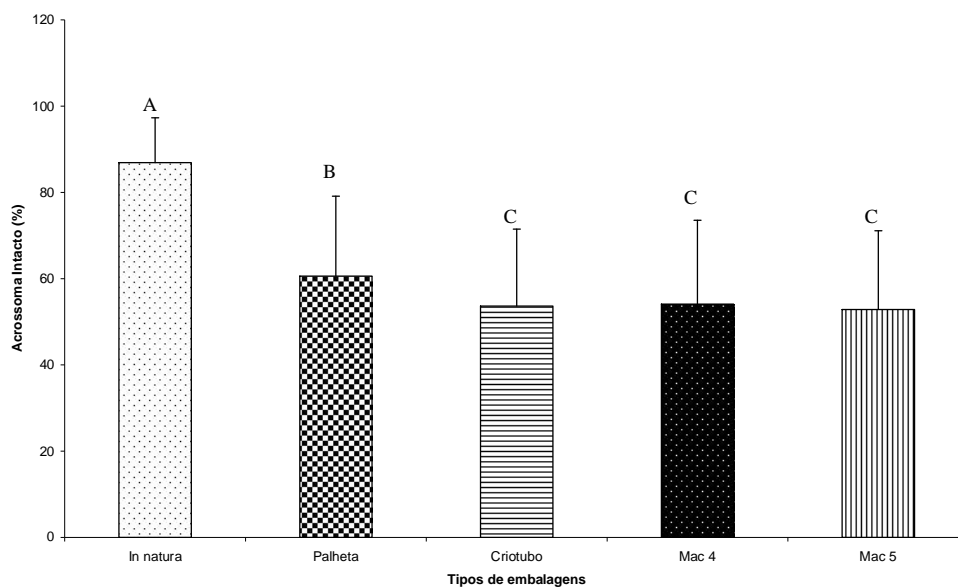


Figura 4: Análise da morfologia espermática do sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens, sob a forma *in natura* e após descongelação e incubação à 37 °C em banho-maria.

Mais uma vez, para a característica morfologia espermática, as diferenças entre o sêmen *in natura* e o criopreservado foram significativas ($p < 0,05$). Entretanto, viu-se uma maior queda do número de células com acrossoma intacto, no sêmen proveniente das embalagens com maior diâmetro (Criotubo; Mac 4 e Mac 5) ($p < 0,05$).

O tipo de embalagem utilizada na criopreservação do sêmen suíno, parece realmente interferir na qualidade espermática avaliada após descongelação, sendo a distância do raio das mesmas, um detalhe a ser considerado como um dos fatores que pode estar relacionado a esta interferência. Córdova *et al.*, (2000) e Izquierdo *et al.*, (2005), propuseram que a forma e o volume do recipiente poderiam influenciar na qualidade do sêmen congelado. O choque térmico entre as células que se encontram nas regiões periféricas e centrais da embalagem, pode induzir ao

aparecimento de danos no acrossoma dos espermatozoides durante o processo de criopreservação. Levando-se em consideração as afirmativas dos autores supra citados, juntamente com os resultados de Eriksson & Rodrigues-Martinez (2000), verificou-se que os resultados deste trabalho apresentaram uma tendência parcial quando comparados aos destes autores, no que diz respeito ao formato das embalagens testadas.

Com relação ao volume, inicialmente pensou-se na possibilidade de sua influência sobre a qualidade do sêmen descongelado, entretanto, levando-se em consideração os resultados obtidos por Eriksson & Rodrig

observou-se que as amostras congeladas em embalagens com diâmetros menores colaboram com a teoria de que o diâmetro tem influência direta na qualidade das células descongeladas.

Na tentativa de se fazer uma projeção dos resultados deste trabalho, correlacionando-os com a possibilidade de fertilização dos espermatozoides suínos criopreservados em diferentes tipos embalagens, faz-se necessário considerar informações obtidas na literatura que indicam da mesma forma, melhores resultados de motilidade e morfologia espermática obtidos em embalagens de menor diâmetro (Izquierdo *et al.*, 2005; Eriksson & Rodriguez-Martínez, 2002; Wevar *et al.*, 1997), o que não significa obrigatoriamente maiores porcentagens de fêmeas gestantes inseminadas com sêmen proveniente de congelação em palhetas.

IV. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho levam a aceitar a teoria de que o raio da embalagem pode influenciar na qualidade das células espermáticas descongeladas, proporcionando uma criopreservação da amostra de maneira mais uniforme; fato este que pode ser explicado pelo uso de embalagens de menor diâmetro, o que permite uma redução da diferença de temperatura entre as células da porção periférica e central da amostra. Desta forma, a embalagem mais adequada para uma melhor conservação do sêmen suíno é aquela que possibilita uma congelação mais uniforme da amostra de sêmen contida no seu interior, no caso, a palheta de 0,5 mL.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BWANGA, C.O., EKWALL, H., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Cryopreservation of boar semen III. Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing. *Acta Veterinaria Scandinavica*. V.32,p.463-471. 1991.
2. BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J. Repro. Fert.* 75, p.133-138, 1985.
3. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed., 1988.

4. CÓRDOVA, A., PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F., LLEÓ, B., GARCÍA-ARTIGA, C., ALVAREZ, A., DROBCHAK, V., MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 mL straws. *Theriogenology* v.57, p.2119-2128. 2000.
5. ERIKSSON, B.M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpaks and maxi-straws. *Animal Reproduction Science*. v.63, p.205-220. 2000.
6. ERIKSSON, B.M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Deep-Freezing of Boar Semen in Plastic Film 'Cochettes'. *J. Vet. Med. A* v.47, p.89-97 2002.
7. FAZANO, F.A.T. Zur kryokonservierung von ebersperma; verschiedene verfahren zur samenbehandlung und unterschiedliche konfektionierungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der einfriergeschwindigkeit. 1986. 86f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de veterinária de Hannover, Niedersachsen. Alemanha. 1986.
8. HOFMO, P.O., ALMLID, T. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals Supplement*. V. 1, p.111-122. 1991.
9. HOLT, V.W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p. 47-58, 2000.
10. IZQUIERDO, A.C., JIMÉNEZ, M.S.C., JIMÉNEZ, C.A.L., GUTIÉRREZ, J.P., RILLO, S.M. Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides. *Ciencias Naturales y Agropecuarias*. V.12, p.271-274. 2005.
11. OEHNINGER, S.; DURU, N.K., SRISOMBUT, C, MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.169, p.3-10, 2000.
12. PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. v.38, p.209-222. 1992.
13. PAQUIGNON, A; AERGOUNN, D., COUROT, A., AESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verret: étude *in vitro*. *In: JRP en France*, V.6, p.71-76. 1974.
14. PEÑA, F.J.; SARAIVA, F; NÚÑES-MARTÍNEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Animal Reproduction Science* 93, p.101-113, 2006.

15. STORNELLI, M.C., TITTARELLI, C.M., SAVIGNONE, C.A., STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25 (2): 28-35, 2005.
16. SUKHATO, P.; THONGSODSEANG, S.; UTHA, A.; SONGSASEN, N. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 67, p.69-77, 2001.
17. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. V.60-61,p.481-492. 2000
18. WEITZE, K.F., STAMPA, E., RICHTER, L., WILLMEN,T., WABERSKI,D. Fertility of frozen boar semen: Influence of packaging number of inseminations and seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals Supplement*. V.1,p.139-142. 1991.
19. WEVAR, V. C.; TORRETTA, M. E.; FORCHETTI, O. Evaluación de dos técnicas de congelación de semen porcino. Resultados preliminares de fertilidad. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5: (1), p.448-449, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMLID, T.; JOHNSON, L.A., Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Anima Science** 66 (4), p.2899-2905, 1988.
2. ALMLID, T.; CLARK, R.N.; PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Effectiveness of in vitro methods for predicting in vivo fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2 % or 4 % glycerol. **Zuchthygiene** 24, p.8-15, 1989.
3. BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. **J. Repro. Fert.** 75, p.133-138, 1985.
4. BERGER, B.; FISCHERLEITNER, F. On deep freezing of boar semen: Investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extender. **Reproduction in Domestic Animals** 27, p.266-270, 1992.
5. BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Emprego de sêmen congelado na IA de suíno. **Suinocultura em ação. Inseminação artificial na suinocultura tecnificada.** p.159-179, 2005.
6. BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Criobiology** 31, p.224-238, 1994.
7. BUHR, M.M.; PETTITT, M.J. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement. **Reproduction in Domestic Animals.** 31(1), p.147-152, 1996.
8. BUHR MM, He, L. and Kasimanickam V. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation Proceedings of the 4th **International Conference on Boar Semen Preservation O8.** 1999.

9. BWANGA, C.O.; HOFMO, P.O.; GREVLE, I.S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In vivo fertilizing capacity of deep frozen boar sêmen packaged in plastic bags and maxi-straws. **J. Vet. Med** 38, p281-286, 1991.
10. BWANGA, C.O. Cryopreservation of boar semen I: a literature review **Acta Veterinaria Scandinavica** 32, 431–453, 1991.
11. CAVALCANTE, M.B. Criopreservação de sêmen humano: Comparação entre dois métodos de congelamento e armazenamento. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 98p., 2004.
12. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed., 1988.
13. CEROLINI, S.; MALDJIAN, A; PIZZI, F; GLIOZZI, M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction** 121, p.395–401, 2001.
14. CLARKE, R.N.; JOHNSON, L.A. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and penetration of zona-free hamster ova in vitro. **Gamete Research** 11, p.193-204, 1987.
15. CÓRDOVA, A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F.; LLÉO, B.; GARCIA-ARTIGA, C.; ALVAREZ, A.; DROBCHAK, V.; MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar sêmen packaged in 0.5 and 5 mL straws. **Theriogenology** 57, p.2119-2128, 2002.
16. COURTENS, J.L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson, L.A.. Larson, K. (Ed.) Deep freezing of boar semen. **Swedish University Agriculture Science**, Uppsala, p.61-87, 1985. Courtens & Paquignon, 1985

17. CRABO, B.G.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. **Acta. Vet. Scand** 12, P.125-127. 1971.
18. CRITSER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V.; ARNERSON, B.W.; BALL, G.D. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. **Fertil Steril** 50, P.314-20, 1988.
19. De LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLEBRABDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology** 27, p.171-183, 1990.
20. De LEEUW, F.E.; COLEBRADDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**. 1, p.95-104, 1991.
21. ERIKSSON, B.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. **Animal Reproduction Science** 63, p.205-220, 2000.
22. ERIKSSON, B.M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Deep-Freezing of Boar Semen in Plastic Film 'Cochettes'. **J. Vet. Med. A** v.47, p.89-97 2002.
23. FAZANO, F.A.T. Zurkryokonservierung von ebersperma verschiedene verfahren zur samenbehandlung und unterchiedliedliche konfektionierungsmethoden unter besonderer berücksichtigung der einfriergeschwindigkeit. **Thesis**, Hannover Veterinary College., 1986.
24. FLOWERS, V.L. Management of boars for efficient semen production. **J. Reprod. Fertil.** 52, p.67-78, 1997.
25. GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K.; Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biol. Reprod** 58, p.28-36, 1998.

26. GONZALEZ, R.A.F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 92p., 2004.
27. GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKI-LAURILA, M.; BOWER, R.E. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar spermatozoa. **A.I. Dig.** 19, p.12-14, 1971.
28. HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.** 11, p.73–88, 1990.
29. HOFMO, P.O., ALMLID, T., Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. In: Johnson, L.A., Rath, D. Eds. , **Boar Semen Preservation II**. Paul Parey, Berlin, pp.111–122, 1991.
30. HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm os cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology** 53, p.47-53, 2000.
31. IZQUIERDO, A.C.; JIMÉNEZ, M.S.C.; JIMÉNEZ, C.A.L.; GUTIERREZ, J.P.; RILLO, S.M. Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides. **Ciencias Naturales y Agropecuarias**. 12, p.271-274. 2005.
32. JOSH, A.; BAG, S.; NAQVI, S.M.K. SHARMA, R.C. MITTAL, J.P. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. **Small Ruminant Research** 56, p.231–238, 2005.
33. KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Hum Reprod** 17, p.1863-74, 2002.

34. KIRK, E.S.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology** 64, p.1422–1439, 2005.
35. LARSON, K. Deep-freezing of boar semen. **Cryobiology** 15, p.352-354, 1978.
36. LEIBO, S.P.; PICTON, H.M.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of human spermatozoa. In: Vayena, E.; Rowe, P.J.; Griffin, P.D. **Current practices and controversies in assisted reproduction**. Genova: WHO. p.152-65. 2002.
37. LEOPARDO, E.D. Membranes, Metabolism and Dry Organisms, Cornell Univ. Press, NY. 1986.
38. LÓPEZ, A.S. Congelación de semen de porcino. 2006. Disponible em: <http://www.hypor.com/spain/dbdocs//3fe19dce61ddc.pdf>
39. MARCUS-BRAUN, N.,; BRAUN, G.; POTASHNIK, G.; HAR-VARDI, I. Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 116, p.63-66, 2004.
40. MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; FARRANT, J.; CHU, E.H.Y.; HANNA, M.G. Jr.; SMITH, L.H. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: Wolstenholme, . G.E.W., O'Connor, M. Eds., **The Frozen Cell**, p. 69–88. 1970.
41. MAZUR, P., Freezing of living cells: Mechanisms and implications, **Am J Physiology** 247, p.125-142, 1984.
42. MAZUR, P., Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, **J. General Physiol.** 47, p.347-369. 1985.

43. MOURA, J.C.A. Einflub einer intrazervkalen application von semiplasma und östrogenen cuif spermientransport und befruchtungsergebnisse nach besamung mit iefgefrorenem ebesperma. Hannover (**Tese de Doutorado**), Medicina Veterinária, 96p. 1997.
44. OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology** 169, p.3-10, 2000.
45. OSINOWO O.; SALAMON, S. Examination of some processing methods for freezing boar semen. **August. J. Biol. Science.** 29, p.325-333, 1976.
46. PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Ver. Bras. Reprod. Anim.** 24(1), p.39-44, 2000.
47. PAQUIGNON, A; AAERGOUMN, D.; COUROT, A.; AESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence du verrat: étude *in vitro*. **In:JRP en France**, 6, p 71-76, 1974.
48. PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology** 29, p.255–266, 1992.
49. PARKS , J. E.; GRANAM, J. K.. Effects os cryopreservation procedures on sêmen menbranes. **Theriogenology** 38, p.209-222, 1992.
50. PEÑA, F.J.; SARAIVA, F; NÚÑES-MARTÍNEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Do different portions of the

- boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? **Animal Reproduction Science** 93, p.101–113, 2006.
51. POLGE, C; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Retrieval of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature** 164, p.666-667, 1949.
52. POLGE, C.; SALAMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical inseminations. **Vet. Rec.** 87, p.424-428, 1950.
53. PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, p.1-11, 2005.
54. PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A., Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa, **Journal Animal Science**, 1162, 1971.
55. PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa **Journal of Animal Science** 37, P.528–531, 1973.
56. REIS, F.T. Colheita, avaliação e manipulação do ejaculado suíno. **Ver. Brás. Rep. Anim.** 21:(3), p.22 a 29, 1997.
57. 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.** 26, p.219-230. 1973.
58. SCHEID, I.R. Comercial swine artificial insemination in Brazil: development and current use. **Reproduction in Domestic Animals.** 1. p.299-301, 1991.

59. SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S.; MEINKE, W.; FREITAS, A.R. Eficiência à campo do sêmen suíno congelado. Comunicado técnico **EMBRAPA-CNPSA**, n.46, p.1-3, 1982
60. SCHEID, I.R. Tiefgefrierkonservierung Von ebesamen in kunststoffrohren erpronbung der gefrierschutzsubstanzen glycerin, dimethylsulfoxyd und acetamid. 1980, 98f. (**Tese de doutorado**) – Escola superior de veterinária de Hannover, Niedersachsen, Alemanha, 1980.
61. SMITH, A.U.; POLGE, C. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Veterinary Record** 62, p.115-6, 1950.
62. STAMPA, E. Befruchtungsfhigkeit von tiefgefronrenem ebesperma; Einfluss von konfektionierung, besamungshufigkeit und seminalplasma. **Thesis**, Hannover Tierrtzliche hochschule. 1989.
63. STEPONKUS, P.L.; STOUT, D.G.; WOLFE, J.; LOVELANCE, R.V.E. Possible role of transient electric fields in freezing-induced membrane destabilisation. **J. Memb. Biol.** 85, p.191-198. 1985.
64. SIMMET, C. Kältephysikalische aspekte der gerfrierkonservierung von ebesperma in ihrer auswirkung auf samenqualität und befruchtungsrate. 1993 87f. (**Tese de doutorado**) – Escola superior de veterinária, Alemanha, 1993.
65. SIMMET, C. Boar semen extenders: What they are and how to use them. **Industria porcina**, 16(5), p.15-16, 1996.
66. STEWART, D.L. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Veterinary Record** 63, p.65-6, 1951.
67. STORNELLI, M.C., TITTARELLI, C.M., SAVIGNONE, C.A., STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, 25 (2): 28-35, 2005.

68. SUKHATO, P.; THONGSODSEANG, S.; UTHA, A.; SONGSASEN, N. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 67, p.69-77, 2001.
69. THILMANT, P. Congélation du sperm de verrat en paillette de 0,5 mL. Résultats sur le terrain. **Ann. Méd. Vét.** 141, p.457-462, 1997.
70. TONIOLLI, R. Biotecnologia da Reprodução. Aspectos reprodutivos do varrão. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, **Anais**. V.2. p.183-95, 1991.
71. TONIOLLI, R.; BARITEAU, F.; BUSSIÉRE, J.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y. Conservation prolongée du sperme frais de varrat. **Journées Rech. Porcine en France**, v.27, p.67-70, 1995.
72. TONIOLLI, R; Bussieri, J; Courot, M; Magistrini, M & Combarnous, Y. Effect of indole-3-acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. **Reprod. Nut. Develop** 36, p.503-551, 1996.
73. WATSON, P.F., Artificial insemination and the preservation of semen. *In*: Lamming, G. Ed., **Marshall's Physiology of Reproduction vol. 2** Churchill Livingstone, Edinburgh, London, pp. 747–869. 1990.
74. WATSON, P.F., Recent Developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.** 7, p.871-891, 1995.
75. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science** 60, p. 481-92, 2000.

76. WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 58C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility** 62, p.483–492, 1981.
77. WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine Insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology** 57, p.1683-1693, 2002.
78. WATSON, P.F. Cooling os spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**. 31, p.135-140, 1996.
79. WATSON, P.F.; PLUMMER J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: Johnson, L.A.; Larson, K. (Ed.) Deep freezing of boar semen. Swedish University of agricultural Science, Uppsala, p.113-127, 1985.
80. WEVAR, V. C.; TORRETTA, M. E.; FORCHETTI, O. Evaluación de dos tecnicas de congelación de semen porcino. Resultados preliminares de fertilidad. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 5: (1), p.448-449, 1997.
81. WEITZE, K.F., STAMPA, E., RICHTER, L., WILLMEN,T., WABERSKI,D. Fertility of frozen boar semen: Influence of packaging number of inseminations and seminal plasma. **Reproduction in Domestic Animals Supplement**. V.1,p.139-142. 1991.
82. WILMUT, I.; POLGE, C. The freezing of boar spermatozoa. Proceeding of **VII International Congress of Animal Reproduction and A.I.** Munic, p.1615. 1972.
83. WOLF, J; BRYANT, G. Thermal and physical stresses at low temperature and/or low hydration. **Cellular cryobiology and anhydrobiology**, 2004.
84. WOLKEN, A.; RATH, D.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; MARQUETTI, A. Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. **Theriogenology** 57:(1), p.392, 2002. (Woelders, 1997).

- 85.ZHENG, Y.S.; FISER, P.S.; SIRARD, M.A. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2% or 6% glycerol for in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro. **Theriogenology** 38, p.1065-1075, 1992.

11. ANEXOS

11.1 - Anexo I:

Escores para a nota de vigor CLASSIFICAÇÃO DO VIGOR ESPERMÁTICO SEGUNDO AS CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAS (ANÁLISE QUALITATIVA) DOS ESPERMATOZÓIDES DO VARRÃO

A análise do vigor espermático é individual, observando-se em torno de 50 células, aleatoriamente, para a avaliação das características. Após esta análise individual, uma observação coletiva deve ser feita em todas as células do campo do microscópio, a fim de se determinar a proporção das diferentes características de vigor espermático, chegando-se então á nota “quebrada”. Para uma análise confiável, ao menos três campos de microscópios devem ser avaliados. Esta classificação corresponde a um grupo de características para cada nota inteira dentro do intervalo de avaliação. Os valores quebrados são dados pelas características intermediárias as de notas inteiras consecutivas que a enquadrem, levando-se em consideração a proporção de espermatozóides dentro de cada valor inteiro na análise coletiva de todas as células. Nas tabelas à seguir, serão colocados os parâmetros através dos quais são dadas notas de 0 a 5, e onde se vê as características individuais à serem consideradas juntamente com a incidência de cada uma delas demonstrada pelo número de cruces (TONIOLLI, 1996):

NOTA	CARACTERISTICAS
0,0	Todos os espermatozóides estão imóveis.
0,5	Movimentos esporádicos, fracos e sem deslocamento.
1,0	Movimentos circulares contínuos e fracos. Deslocamento muito lento ou sem deslocamento; tremores do sptz e fracas oscilações do flagelo de eficácia nula.
1,5	Movimentos circulares fracos c/ deslocamento ($\pm 50\%$), espermatozóides não saem do campo do microscópio.
2,0	Movimentos circulares fracos e desorganizados c/ deslocamento sem sair do CM. Tremores c/ alguns sptz se deslocando mais rápido. Oscilações fracas do flagelo.
2,5	Movimentos circulares/retilíneos, médios c/ deslocamento, espermatozóides saem do campo do microscópio. Oscilações do flagelo de intensidade média.
3,0	Movimentos retilíneos, alguns curvilíneos sem tremores e c/ raio bem maior com oscilações intensas do flagelo; espermatozóides saem do C.M. (50 à 60%).
3,5	Movimentos retilíneos fortes e intensos com deslocamento, espermatozóides saem do CM (60 à 70%), com oscilações fortes do flagelo.
4,0	Movimentos retilíneos, fortes e intensos com deslocamento, espermatozóides saem do CM (70 à 80%); com oscilações fortes do flagelo.
4,5	Movimentos retilíneos e flechantes, fortes, espermatozóides saem do campo do microscópio (80 à 90%); com oscilações muito fortes do flagelo.
5,0	Movimentos retilíneos e flechantes muito fortes, sptz saem do CM ($\geq 90\%$); com oscilações muito fortes do flagelo.

Obs: CM = Campo do microscópio

Motilid.	(A) Deslocam.	(B)	MOVIMENTOS (C)					
			Não progressivo		Progressivo			
			Rotativo	Circular	Circular	Retilíneo	Flechante	
0,0	-	-						
0,5	-	±	*					
1,0	±	+		*				
1,5	+	+		*				
2,0	+ ±	+			*			
2,5	++	++			*	*		
3,0	++ ±	++			*	*		
3,5	+++	+++				*		
4,0	+++ ±	+++				*		
4,5	++++	++++				*	*	
5,0	+++++	+++++				*	*	

A) Deslocamento	=	Presente (+), ausente (-), presença de um número fraco de espermatozóides com leve movimento (±). A classificação varia de 1 a 5 cruces, segundo a velocidade de deslocamento.
B) Vigor	=	É a frequência de batimentos do flagelo, classificado de 0 (-) a 4 cruces (+).
C) Movimentos	=	A presença de um (*), indica o tipo de movimento efetuado pelo espermatozóide.

TIPOS DE MOVIMENTOS	
Rotativos	= Movimentos de rotação em torno de si mesmo sem deslocamento.
Circulares	= Movimentos inscritos dentro de um círculo de raio pequeno (sem deslocamento) ou de raio grande (com deslocamento).
Retilíneos	= Deslocamento em linha reta.
Flechantes	= Deslocamento em linha reta em grande velocidade.

Fonte: Toniolli, R. (Tese de Doutorado, 91p., 1996).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)