

## USO DO DILUENTE BTS NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO: II. MODIFICAÇÕES NA TÉCNICA

(The BTS extender use in the swine semen freezing process:  
II. Modifications in the technique)

TONIOLLI, R.<sup>1</sup>; TONIOLLO, G.H.<sup>2</sup>; FRANCESCHINI, P.H.<sup>2</sup>; MORATO, F.M.A.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; <sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista-Campus de Jaboticabal

### RESUMO

O sêmen de sete reprodutores foi coletado utilizando a técnica da mão enluvada sendo utilizado o ejaculado total. De cada ejaculado foi retirado  $10,2 \times 10^9$  spz para cada tratamento. A qualidade do sêmen foi avaliada pela concentração ( $\times 10^6$  spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz), vigor espermático (0 a 5), porcentagem de células móveis (%), morfologia espermática (%) e integridade de membrana espermática (%). O sêmen foi diluído no Beltsville Thawing Solution (BTS). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, utilizando-se o teste de Mann Whitney, com análise das diferenças entre médias feita por variância multifatorial com o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03), a um intervalo de confiança de  $p < 0,05$ . Vários tratamentos foram propostos: diferentes volumes do diluente de resfriamento/congelação (18mL, 9mL, 6mL, 4mL); diferentes açúcares (glicose, frutose, lactose, sacarose); diferentes crioprotetores (glicerol, etileno glicol, propileno glicol, óleo mineral) e uso da gema de ovo em pó. O menor volume do diluente gema de ovo usado sem influenciar negativamente a qualidade espermática foi de 6 mL. A glicose obteve os melhores resultados, particularmente na de porcentagem de membrana intacta (25%). Dentre os crioprotetores utilizados, é desaconselhável o uso do óleo vegetal devido a menor motilidade espermática (15%) e de células com membrana intacta (0%). O uso da gema de ovo em pó pode ser recomendado devido a sua melhor qualidade sanitária. De uma maneira geral as modificações propostas pelo protocolo de trabalho não apresentaram os efeitos esperados.

Palavras-Chave: Criopreservação, sêmen suíno, conservação, varrão.

### ABSTRACT

The semen of seven swine males was collected by the glove handled technique, being used the total ejaculated. It was separate from each one a total of  $10,2 \times 10^9$  spz, distributed among the treatments. The semen quality was evaluated by the concentration ( $\times 10^6$  spz/mL), volume (mL), total of spermatozoas ( $\times 10^9$  spz), spermatic vigour (0 to 5), movable cells (%), spermatic morphology (%) and spermatic membrane integrity (%). The semen was diluted in Beltsville Thawing Solution. The experimental statistic test used was the maybe blocks, with the Mann Whitney analysis, in the Lineal General Models of Statistical Analysis System Program (SAS 6.03), with a trust interval of  $p < 0,05$ . Several treatments were proposed: differents volumes of freezing extender (18mL, 9mL, 6mL, 4mL); differents sugars (glucose, fructose, lactose, sucrose); different cryoprotectants (glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, mineral oil) and use of yolk egg powdered. The smallest volume in the egg yolk extender used without negative influence in the spermatic quality was 6mL. The glucose obtained the best results, particularly in the percentage of intact membrane (25%). Among the cryoprotectants used, the use of the mineral oil is inadvisable due the smaller spermatic mobility (15%) and the cells with intact membrane (0%). The use of the egg yolk powdered can be recommended due to your best sanitary quality. In a general way the modifications proposed by the work protocol they didn't present the expected effects.

Keywords: Cryopreservation, swine semen, conservation, boar.

\* Endereço para correspondência:

[toniolli@roadnet.com.br](mailto:toniolli@roadnet.com.br)

## INTRODUÇÃO

A técnica de criopreservação seminal é importante tanto para pecuária quanto para a biotecnologia, permitindo o intercâmbio de germoplasma de animais geneticamente superiores bem como a preservação de espécies ameaçadas. Dentre as vantagens da técnica presente, a otimização e utilização de animais selecionados, que permite o armazenamento do sêmen apesar das barreiras geográficas, facilitando seu transporte em todo o mundo e superando problemas de tempo e distâncias (BARRETO et al., 2008).

Entretanto, o ejaculado suíno tratado pela técnica de criopreservação tem uma utilização bastante restrita (Saraiva et al., 2005), estando limitado ao uso em trabalhos de melhoramento e de difusão de material genético (Scheid e Silveira, 2002). A utilização do sêmen sob a forma congelada, ainda traz grandes desafios, necessitando do desenvolvimento de uma nova técnica de congelação, uma vez que o sêmen suíno apresenta uma maior sensibilidade à baixas temperaturas, particularmente em protocolos de congelação (Antunes, 2007), devendo-se também ser considerada a curva de resfriamento e a descongelação (Johnson et al., 2000).

Os diferentes protocolos de criopreservação de sêmen incluem passos críticos, tais como resfriamento, congelação e descongelação. Visando a viabilidade de tais processos, é necessária a utilização de diluentes e substâncias apropriados para cada um dos passos acima mencionados. Ejaculados tratados de forma adequada durante os protocolos de congelação, tem maiores probabilidades de após a descongelação manterem uma melhor viabilidade espermática de modo a permitir o uso do sêmen na inseminação artificial (Silva, 2007; Silva et al., 2011).

Numerosos trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de se

desenvolver um diluente capaz de manter valores mais altos da motilidade espermática, com os pesquisadores se concentrando no aprimoramento dos processos de congelação de sêmen para uso em animais e seres humanos (Schmitt et al., 2003). Com esta finalidade, substâncias e meios como o cálcio (Robertson et al., 1988), leite desnatado (Scobey et al., 1995) e gema de ovo (Phillips, 1939; Salisbury et al., 1941) foram utilizadas em diluentes para o sêmen do touro, carneiro e do homem, respectivamente. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma nova tecnologia de congelação do sêmen do varrão, com a finalidade de se obter maior número de espermatozoides viáveis pós descongelação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reprodutores, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

O sêmen de 07 (sete) reprodutores foi coletado uma vez por semana durante dez semanas, empregando a técnica da mão enluvada, em copo plástico de coleta, com capacidade de 500 mL, coberto por gaze e protegido por envoltório térmico. Cada animal foi coletado dez vezes ( $n = 70$  ejaculados). Todos os reprodutores utilizados no experimento pertenciam a Granja Estiva, município de Jaboticabal, São Paulo e encontravam-se em sistema rotineiro de coleta, sendo utilizado o ejaculado total após separação da parte gelatinosa através de filtro. Após a coleta, o ejaculado era identificado e levado em seguida ao laboratório para o seu processamento. A fração gelatinosa retida pela gaze era desprezada. Após as primeiras avaliações do ejaculado *in natura*, o sêmen era diluído dentro da primeira meia hora pós coleta, de acordo com os tratamentos experimentais: sêmen e diluente se encontravam sempre na mesma temperatura (30 °C).

A qualidade do ejaculado *in natura* foi avaliada através das seguintes características: volume (mL) em balança digital de precisão, concentração ( $\times 10^6$  spz/mL) em espectrofotômetro, total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz) que é o volume  $\times$  concentração, vigor espermático (0 a 5; Toniolli, 1996) e motilidade espermática (% células móveis). As análises do vigor e motilidade foram feitas através da microscopia óptica, em aumento de 200x, colocando-se uma gota de sêmen de 15  $\mu$ L entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C. Foram considerados nas análises de cada característica, ao menos três campos de microscópio.

### Tratamentos experimentais

#### 1. Diferentes Volumes do diluente Gema de Ovo:

Foram testados diferentes volumes do diluente gema de ovo/glicose, formando os tratamentos de acordo com o volume final: a) T1 = 18 mL (controle – Paquignon, 1984); b) T2 = 9 mL; c) T3 = 6 mL; d) T4 = 4 mL.

2. **Diferentes açúcares:** Foi substituída a glicose do diluente gema de ovo/glicose por outros três tipos de açúcares na mesma concentração (5,67 g), formando os seguintes tratamentos: T1 = glicose (controle); T2 = frutose; T3 = lactose e T4 = sacarose.

3. **Teste de Crioprotetores:** Foram testados diferentes crioprotetores adicionados ao diluente de congelação (concentração final de 2%). Os diferentes tratamentos formados foram: a) T1 = Glicerol (GLY - Controle); b) T2 = Etileno Glicol (EG); c) T3 = Propileno-Glicol (PG); d) T4 = Óleo Mineral (OM).

4. **Substituição da gema de ovo:** A gema de ovo *in natura*, foi substituída pela gema de ovo em pó nos diluente gema de ovo, formando os seguintes tratamentos: T1 = BTS + gema de ovo *in natura*; T2 = BTS + gema de ovo em pó.

OBS: O trabalho foi dividido em diversos experimentos, de acordo com cada tratamento experimental e foram executados separadamente em sequência, conforme numeração de cada um deles. Após cada tratamento executado, visando a sequência do trabalho, foi utilizado o melhor resultado para a execução do tratamento seguinte, sendo mantido até o final do experimento. Toda a coleta de amostras para as análises foi realizada após a descongelação e ressuspensão do sêmen.

### Congelação do sêmen

O sêmen foi coletado com a finalidade de ser congelado, sendo retirado um total de 10  $\times 10^9$  spz de cada ejaculado para cada tratamento do sêmen e testes *in vitro*. A congelação foi feita conforme o disposto na tabela 1 abaixo:

**Tabela 1:** Tratamento do sêmen no abaixamento da temperatura visando a congelação.

Pré-Dil. BTS 1:1	1ª Estabiliz.	2ª Estabiliz.	Centrif. 800g/15'	Diluente Resfriam.	3ª Estabiliz.	Diluente Congelação	Envaze palhetas	Vapor N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
30 °C	30 °C/2 h	15 °C/2 h	15 °C	15 °C	5 °C/1 h	5 °C	5 °C	4 min	≥15d

PS.: O tratamento foi estruturado de acordo com Pena *et al.* (2003) modificado.

Após a coleta, as amostras de sêmen foram diluídas em partes iguais (1:1) no diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) à temperatura de 30 °C, permanecendo

incubada por 2 horas. Após este período, o sêmen foi colocado a 15 °C por mais 2 horas, centrifugado a 800g por 15 minutos e adicionado do diluente de resfriamento (9

mL). Em seguida, o sêmen foi colocado a 5 °C por mais 1 hora, ao final da qual foi acrescido do diluente de congelação (volume a volume = 9mL), levando à uma concentração final de  $500 \times 10^6$  spz/mL; por fim, o sêmen foi envasado em palhetas plásticas de 0,5 mL e selados com álcool polivinílico em pó (PVC) com um total de  $250 \times 10^6$  spz/palheta. Após o envase, as palhetas foram colocadas em uma rampa de congelação (-60 a -70 °C) a 5 cm acima do nitrogênio líquido por 4 minutos, e em seguida submersas em nitrogênio líquido (-196 °C). A gema ovo/glicose (Paquignon, 1984) foi utilizado inicialmente como diluente de resfriamento, sendo constituído de 5,67 g de glicose, 22,5% de gema de ovo, adicionado a 100 mL de água destilada e foi adicionado ao sêmen centrifugado à temperatura de 15 °C. Posteriormente, aos 5 °C, este mesmo diluente acrescido de 4% de glicerol (diluente de congelação) foi adicionado ao sêmen. A concentração final de glicerol para a criopreservação foi de 2% (Polge *et al.*, 1970).

### **Descongelação rápida**

Ela foi feita em aparelho de descongelação Minitub, com água corrente e aquecida a uma temperatura de 37 °C na qual as palhetas eram submersas durante 50 segundos. Após a descongelação, o conteúdo de cada palheta foi ressuspensão no diluente BTS colocado previamente em banho maria a 37 °C. Para as análises *in vitro*, ao volume de cada palheta (0,5 mL) foi adicionado um total de 2 mL do diluente de ressuspensão. A descongelação era feita após pelo menos sete dias de criopreservação das amostras.

### **Análises após descongelação do sêmen**

Visando as análises dos testes *in vitro*, o conteúdo descongelado de cada palheta, era diluído e ressuspensão no diluente BTS. As amostras assim tratadas

eram colocadas em tubos de ensaio e mantidas em banho maria a 37 °C por 10 minutos para em seguida serem analisadas. Após a reconstituição do volume feita através da ressuspensão, a concentração final, que equivale à de uma dose de sêmen criopreservado, era foi de  $100 \times 10^6$  spz/mL.

### **1. Vigor e motilidade espermática (% células móveis)**

De cada amostra descongelada foi avaliado o vigor espermático (0 a 5 - Toniolli, 1996) e motilidade espermática (% de células móveis). O sêmen descongelado e ressuspensão foi incubado a uma temperatura de 37 °C sendo as análises feitas após 10 minutos de incubação, colocando-se uma gota de sêmen de 15 µL entre lâmina e lamínula, com leitura em microscopia óptica a um aumento de 200x. Eram examinados ao menos três diferentes campos do microscópio antes de se chegar a nota final.

### **2. Acrossoma e vitalidade espermática**

Os exames morfológicos foram feitos pela: a) integridade do acrossoma e b) vitalidade espermática (% de células vivas). Foi feito um esfregaço de sêmen, corado pela solução de azul de bromo-fenol, contando-se 200 células/esfregaço em microscopia óptica com objetiva de 100 e um aumento final de 1000x. A solução corante foi formada por: azul de bromo-fenol = 0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada = 10 mL. Juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante e homogenizou-se. Após 30 segundos procedeu-se o esfregaço sendo secado à temperatura ambiente. Os espermatozoides foram classificados em 3 categorias: 1) vivos com acrossoma intacto; 2) vivos com acrossoma danificado e 3) mortos. De cada ejaculado, para cada tratamento, foi realizado um esfregaço de sêmen após descongelação com exames feitos

utilizando-se microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 1000x.

### **3. Integridade da membrana espermática**

Avaliada pela coloração fluorescente em microscopia óptica de campo escuro, com uma mistura de corantes biológicos. Para o meio de coloração, adicionou-se 20µL da solução de formaldeído, 20µL da solução de diacetato de carboxi fluoresceína (DIC) e 10µL da solução de iodeto de propídio (IP) para cada mililitro (mL) da solução salina estoque. Um total de 10µL da suspensão de sêmen, contendo  $10 \times 10^6$  spz/mL foi diluída em 40µL de meio de coloração. Uma alíquota de 5µL da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula sob aumento de 1000x com iluminação epifluorescente, com filtros de fluoresceína padrão (luz azul) e rodamina padrão (cor verde), alternadamente para os corantes DC e IP, respectivamente. Foram contadas 200 células por alíquota corada/tratamento. Os espermatozoides foram classificados em 3 categorias: 1) I = Membrana íntegra. Toda a célula que acumula a DIC (fluorescência verde) ao longo de sua cabeça e flagelo, sem acúmulo da IP (fluorescência vermelha); 2) II = Membrana parcialmente danificada acúmulo de DIC na peça intermediária e/ou região acrossomal, enquanto que a cabeça e cauda se coram com IP; 3) III = Membrana danificada. Acúmulo apenas de IP ao longo da célula.

#### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com as análises das diferenças entre médias feitas por variância multifatorial usando-se o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03, 1988), com um intervalo de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ). As variáveis paramétricas foram submetidas a análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS e as

médias foram comparadas entre os grupos por meio dos testes de Tukey ou T de Student, segundo a sua instabilidade. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Volume dos diluentes de resfriamento e congelamento**

Analisando-se o vigor espermático e a motilidade espermática, dentro dos diferentes tratamentos, os resultados não apresentaram nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ), a exceção do T4 (22%), que teve a menor porcentagem de recuperação de células móveis após descongelamento do sêmen ( $p < 0,05$ ) (figuras 1 e 2). A boa influência da gema de ovo no diluente de sêmen sobre a motilidade espermática vista neste trabalho, também pode ser confirmada em carnívoros conforme resultados de Barbosa et al. (2007). A gema de ovo tem sido utilizada rotineiramente como protetor espermático em processos de resfriamento do sêmen (Watson, 1979), desta forma sua concentração e/ou relação com o volume de sêmen pode influenciar nos resultados de avaliação espermática (Bathgate et al., 2006). Com base nestas informações, pode ser visto neste trabalho que a diminuição do volume do diluente gema de ovo, passou a ter uma influência negativa sobre a porcentagem de espermatozoides móveis quando sua disponibilidade para as células ficou abaixo de 1/3 do volume original (18 mL – controle). Isto pode ser explicado pela queda acentuada da relação diluente/célula, fato este que diminuiu a disponibilidade do mesmo aos espermatozoides, afetando seu metabolismo com uma influência negativa sobre a porcentagem de células móveis. Por outro lado, altas concentrações, dificultam as análises de vigor e motilidade, conforme mostrado pelos resultados deste trabalho e

confirmado por outro autor (Cardoso, 2005).

Analisando-se os resultados da integridade acrossomal, não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ) para as características vivos com acrossoma danificado e mortos; para espermatozoides vivos com acrossoma intacto, o T4 apresentou o valor mais baixo. Por outro lado, os valores encontrados em todos os tratamentos foram inferiores a 50%, apresentando um percentual de queda entre 18 e 25 pontos, com os seguintes valores por tratamento: (T1 = 38%, T2 = 39%, T3 = 37% e T4 = 32%) (Figura 3-A). Estes resultados sugerem mais uma vez que uma diminuição acentuada da relação diluente/célula pode trazer também problemas na preservação da integridade do acrossoma e da vitalidade espermática. O choque térmico é uma das maiores causas de problemas para a membrana acrossomal, entretanto, ele pode ser reduzido através da utilização de diferentes taxas de resfriamento do sêmen, mas também pela incorporação de gema de ovo ao diluente (White, 1993) o que pode ser comprovado neste trabalho pelos menores valores médios obtidos nos tratamentos com maior diluição do diluente gema de ovo. Os benefícios obtidos com a inclusão da gema de ovo em diluentes durante o processo de resfriamento (Salamon e Maxwell, 1995), puderam ser evidenciados nos resultados deste trabalho, entretanto a relação ideal entre diluente e a gema de ovo ainda precisa ser determinada. Muitas hipóteses procuram explicar esta ação benéfica, entretanto mecanismo exato de proteção da gema de ovo permanece ainda desconhecida (Gil *et al.*, 2003).

Na figura 3-B, são apresentados os resultados da integridade de membrana, com uma maior porcentagem de células com membrana intacta, obtidas no T2 (25%). Analisando-se a característica

células com dano parcial de membrana, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, T2, T3 e T4, os quais apresentaram um menor número de espermatozoides danificados; já o T1 apresentou resultados com a maior porcentagem de células danificadas, com diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). O pior resultado, mais uma vez foi encontrado no T4, com apenas 15% de espermatozoides com membrana íntegra ( $p < 0,05$ ). As propriedades de membrana são de suma importância uma vez que sua qualidade e integridade tem ação sobre a sobrevivência da célula após resfriamento e congelamento (Watson, 2007). Uma vez que a presença da gema de ovo no diluente estimula significativamente a viabilidade espermática após diluição (Fernández-Santos *et al.*, 2006) os resultados deste trabalho demonstraram a necessidade de se determinar uma relação ideal diluente/espermatozoide.

### **Substituição da glicose**

Considerando-se o vigor espermático, dentro dos diferentes tratamentos, a análise dos resultados mostrou que a glicose com 2,7 foi o melhor açúcar a ser utilizado no protocolo de congelamento (frutose = 2,4; lactose = 2,2; sacarose = 1,7) ( $p > 0,05$ ) (Figura 4). Para a característica motilidade espermática, apesar do maior valor médio ter sido encontrado para a glicose (44,0%), ela não diferiu da frutose (33,0%;  $p > 0,05$ ), entretanto, sendo melhor que os outros dois tratamentos (lactose = 24% e sacarose = 15%;  $p < 0,05$ ) (Figura 5). Desta forma, quando utilizado o diluente BTS, a melhor opção de açúcar foi a glicose. É possível que este resultado seja reflexo de uma melhor adaptação do metabolismo espermático a este tipo de açúcar, ou ainda que esteja relacionado com a necessidade de uma modificação nos protocolos de

congelamento (Johnson *et al.*, 2000; Antunes, 2007).

Analisando-se os resultados da integridade acrossomal, não houve variação significativa entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ). O número médio de células vivas com acrossoma intacto teve um percentual de queda entre 18 e 33 pontos, ficando abaixo dos 50% (T1 = 32,0%, T2 = 32,0%, T3 = 29,0% e T4 = 26,0%), valores estes ainda considerados razoáveis em se tratando de sêmen congelado (Figura 6-A) (Bianchi, 2006). Apesar de não ter havido nenhuma ação evidente entre os diferentes tratamentos, os resultados demonstram, aparentemente, que a técnica de congelamento utilizada foi adequada.

Na Figura 6-B, são vistos os valores da integridade de membrana, apresentando o T1 (glicose) uma maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra (25,0%;  $p < 0,05$ ) e uma menor porcentagem de células com dano total (67%;  $p < 0,05$ ), em relação aos demais tratamentos. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que a glicose proporcionou uma proteção à membrana do espermatozoide bem melhor do que os outros açúcares (Bianchi *et al.*, 2006). Apesar dos avanços em novas tecnologias e equipamentos visando a congelamento do sêmen (Wolders e Ten Napel, 2005), a glicose parece ser ainda o açúcar de eleição para ser usado nos diluentes de congelamento. De qualquer forma, os estudos que visem o desenvolvimento desta técnica são necessários, principalmente pelo fato de que ela permite a verificação do estado de saúde dos reprodutores, antes, durante e após a produção (Smith, 2006).

### **Substituição do crioprotetor**

Analisando-se o vigor espermático, dentro dos diferentes tratamentos, os resultados não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos (T1 = 2,5;

T2 = 2,5; T3 = 2,4; T4 = 1,9) ( $p > 0,05$ ) (Figura 7). Para a característica motilidade espermática, verificou-se uma mesma tendência (T1 = 25,0%; T2 = 24,0%; T3 = 22,0%) ( $p > 0,05$ ), sendo, entretanto, estes três tratamentos melhores do que o óleo mineral (T4 = 15,0%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 8). Desta forma, o crioprotetor de eleição continua sendo o glicerol, uma vez que já é usado como rotina nos protocolos de congelamento do sêmen suíno. A viabilidade espermática é normalmente reduzida, devido a injúrias celulares provocadas durante todo o processo de congelamento (Bianchi *et al.*, 2006), desta forma o uso de um crioprotetor eficiente é importante. Apesar do glicerol ter também efeito tóxico sobre a célula, ele tem sido usado preferencialmente nos protocolos de congelamento de sêmen. A motilidade espermática ficou em valores abaixo dos encontrados em sêmen canino descongelado (Toniolli *et al.*, 2009), provavelmente devido à diferença de sensibilidade e congelabilidade entre diferentes varrões ao processo de criopreservação.

Analisando-se os resultados da integridade acrossomal e vitalidade espermática, não houve diferenças entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ). Os valores encontrados para o número de células vivos com acrossoma intacto, foram inferiores a 50%, apresentando um percentual de queda entre 25 e 36 pontos, com os seguintes resultados por tratamento: (T1 = 24,0%, T2 = 27,0%, T3 = 26,0% e T4 = 19,0%) (Figura 9-A). Os resultados demonstraram que o tipo de crioprotetor utilizado não influenciou nos resultados finais desta característica. Apesar disso, os resultados indicaram a uma boa eficiência da técnica de congelamento utilizada. Por outro lado a literatura relata que o glicerol em baixas concentrações (1–3%) permite uma melhor sobrevivência pós descongelamento (Almld and Johnson, 1988), sendo ele o crioprotetor

de eleição para o sêmen do varrão (Scheid, 1992). Uma melhor crioproteção favorecendo a integridade acrossomal pode ser negativamente afetada com o aumento da concentração do glicerol (Yi et al., 2001). O declínio substancial de células com acrossoma intacto visto neste trabalho, estão de acordo com os resultados de Maxwell e Johnson (1997), que evidenciaram também a ação benéfica de um período de pré-aquecimento do sêmen a 15 °C durante o resfriamento do sêmen. Neste trabalho este procedimento também foi feito, entretanto a 30 °C, que por ser uma temperatura mais alta, pode ter influenciado negativamente na porcentagem final de células com acrossoma intacto.

Na Figura 9-B, são apresentados os resultados da integridade de membrana, obtendo-se uma maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra nos tratamentos T1 (5,0%), T2 (2,0%) e T3 (3,0%), sem diferenças significativas ( $p>0,05$ ), entretanto, superiores ao T4 (0,0%) ( $p<0,05$ ), onde o óleo mineral demonstrou ser incapaz de proteger a membrana plasmática, pois nenhuma célula com membrana intacta foi encontrada. O espermatozoide do varrão, é o mais sensível ao processo de congelação, com o aparecimento de danos de membrana e de organelas celulares, devido ao estresse osmótico, ao choque térmico e à formação de gelo intra-celular (Watson, 1995). Desta forma a melhor combinação entre tipo de crioprotetor e técnica de congelação, ainda precisa ser encontrada (Pena et al., 2003).

### Uso da gema de ovo em pó

Analisando-se as características vigor espermático e motilidade espermática, não houve diferenças significativas entre tratamentos ( $p>0,05$ ), com os seguintes resultados médios: vigor (T1 = 1,8; T2 = 2,1) e motilidade (T1 = 13,0%; T2 = 17,0%), respectivamente (figuras 10 - 11).

Analisando-se os resultados do acrossoma e de membrana espermática, também não houve uma variação significativa entre tratamentos ( $p>0,05$ ), com os seguintes resultados: vivos com acrossoma intacto (T1 e T2 = 20,0%); vivos com acrossoma danificado (T1 = 28,0%; T2 = 27,0%); mortos (T1 = 51,0%; T2 = 53,0%) (Figura 12-A) e membrana espermática íntegra (T1 = 10,0%; T2 = 14,0%); membrana espermática parcialmente danificada (T1 = 75,0%; T2 = 67,0%); membrana espermática totalmente danificada (T1 = 16,0%; T2 = 19,0%) (Figura 12-B), respectivamente. A porcentagem de células com membrana intacta foi baixa, indicando uma necessidade de revisão de todo o protocolo experimental utilizado, uma vez que segundo a literatura em torno de 50% das células sobrevivem ao processo de congelação (Watson, 1995). De acordo com os resultados, a substituição da gema de ovo *in natura* pela gema de ovo em pó, ainda deve ser considerada, uma vez que o uso deste produto poderá garantir uma melhor qualidade sanitária da dose de sêmen, através da diminuição da contaminação do sêmen devido à ovos infectados.



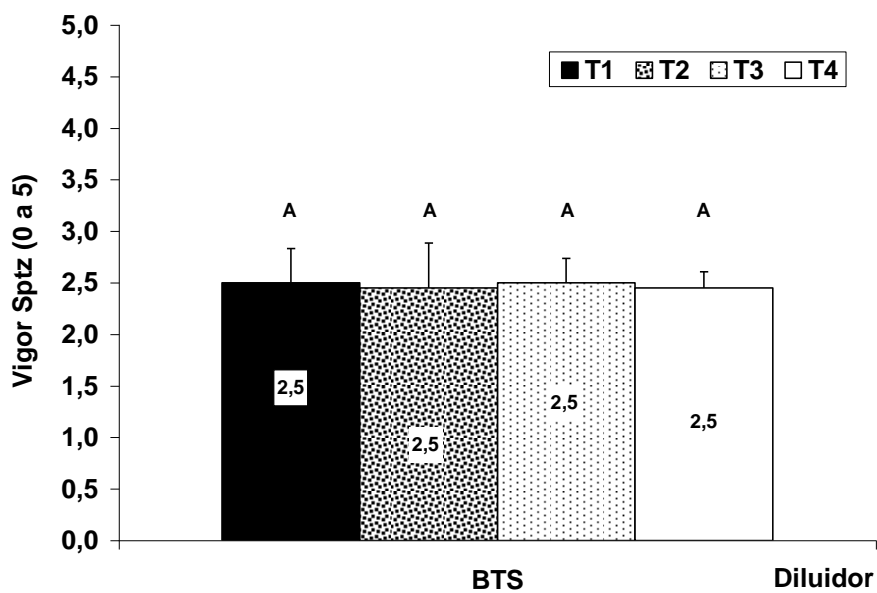


Figura 1: Vigor espermático, do sêmen suíno congelado em diferentes volumes do diluente gema de ovo/glicose, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

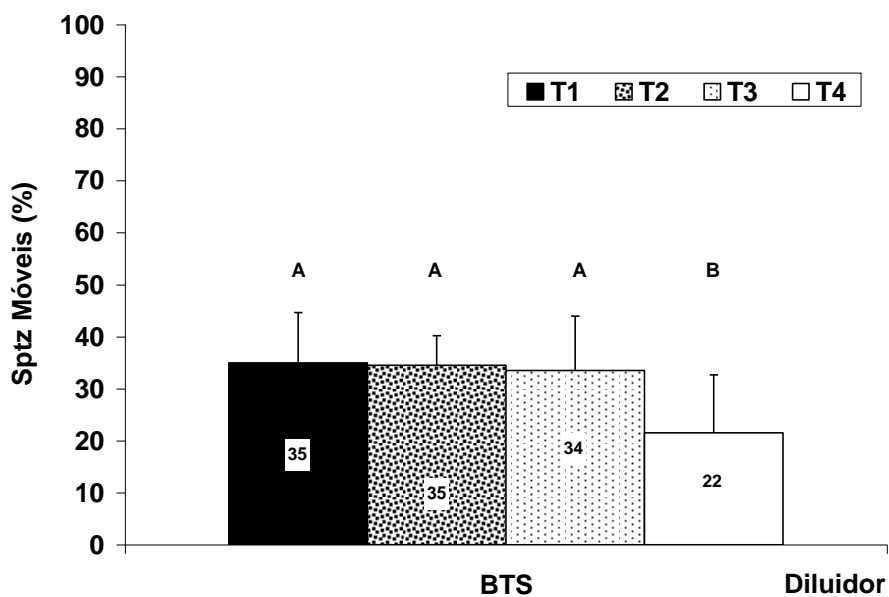


Figura 2: Porcentagem de espermatozoides móveis, do sêmen suíno congelado em diferentes volumes do diluente gema de ovo/glicose, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

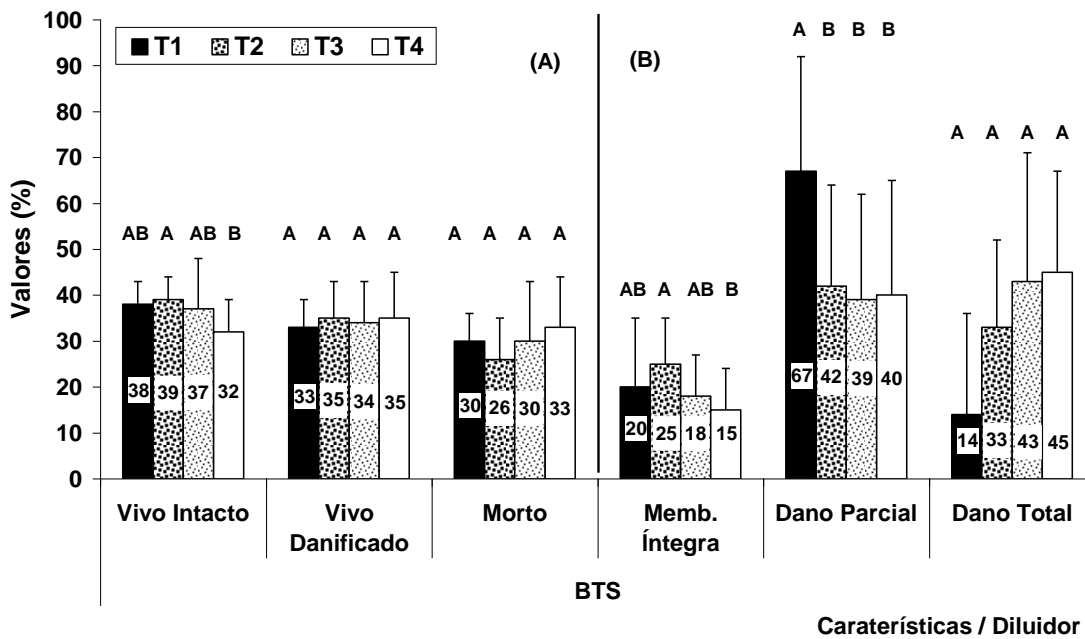


Figura 3: Vitalidade (% células vivas), integridade acrossomal (A) e de membrana do espermatozoide (B), do sêmen suíno congelado em diferentes volumes do diluente gema de ovo/glicose, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

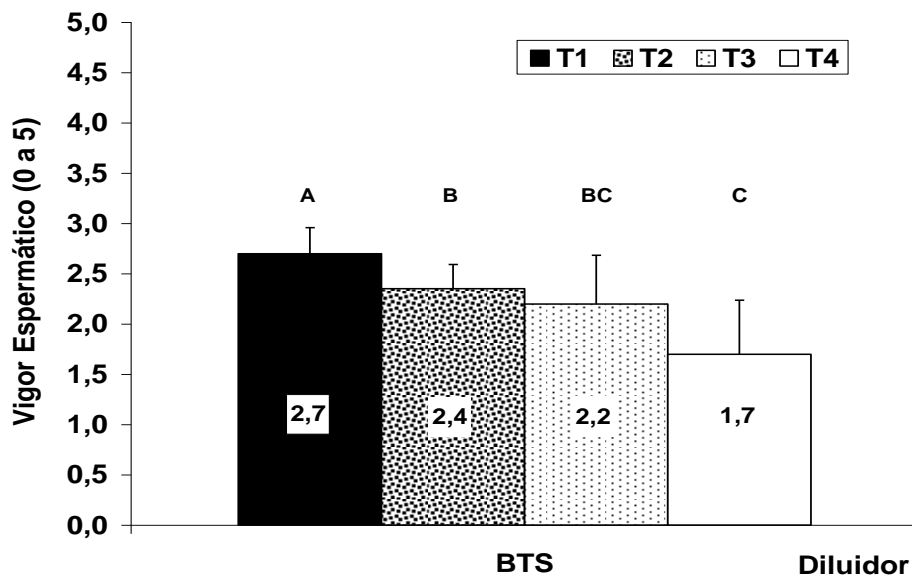


Figura 4: Vigor espermático, do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com diferentes açúcares, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

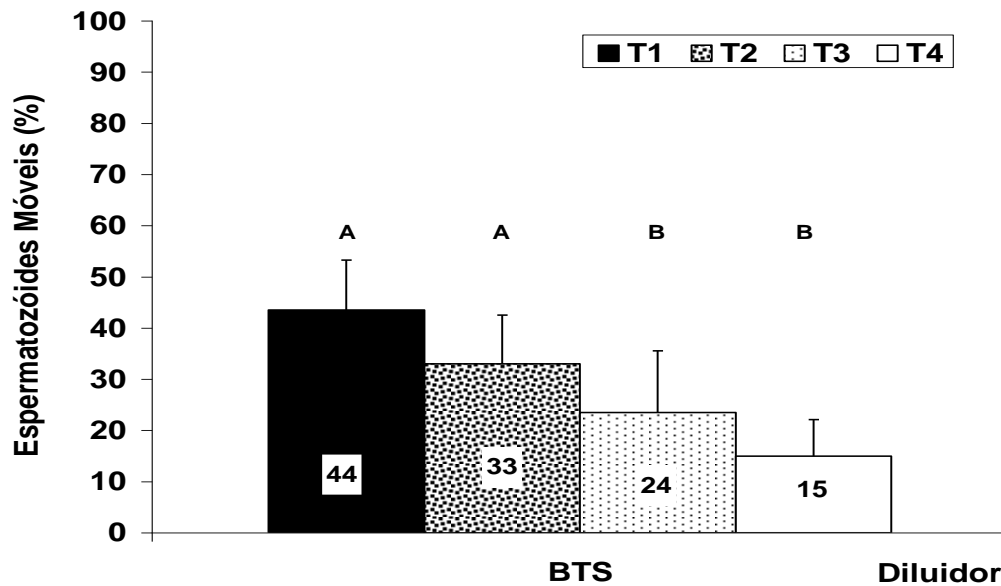


Figura 5: Porcentagem de espermatozoides móveis, do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com diferentes açúcares, após descongelamento e ressuspensão do sêmen em BTS.

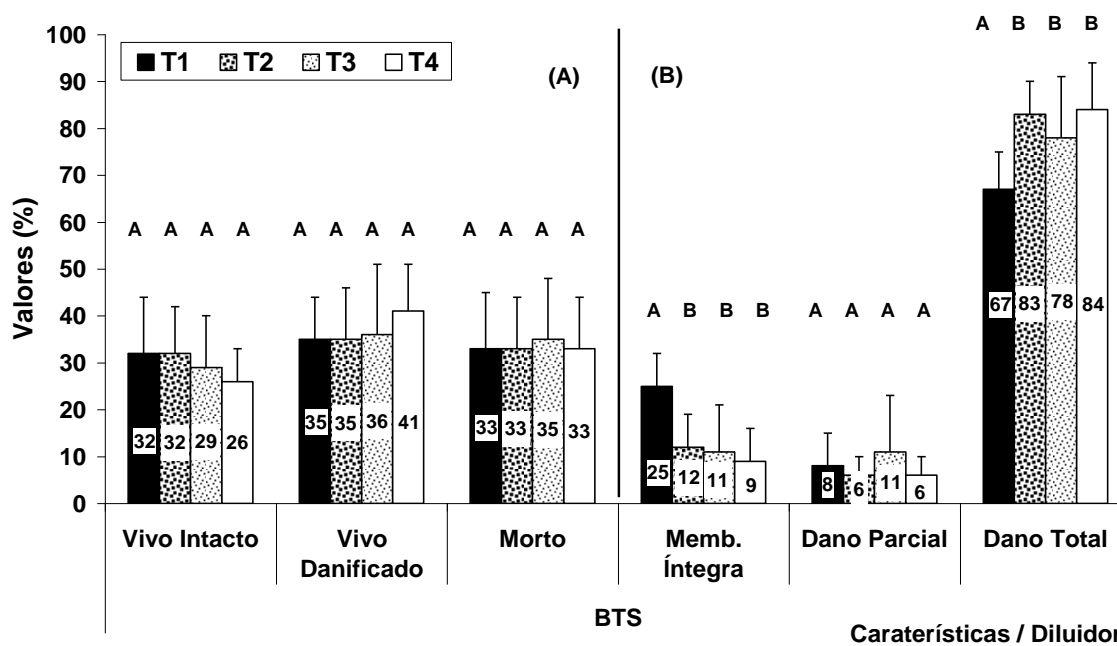


Figura 6: Vitalidade (% células vivas), integridade acrossomal (A) e de membrana do espermatozoide (B), do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com diferentes açúcares, após descongelamento e ressuspensão do sêmen em BTS.

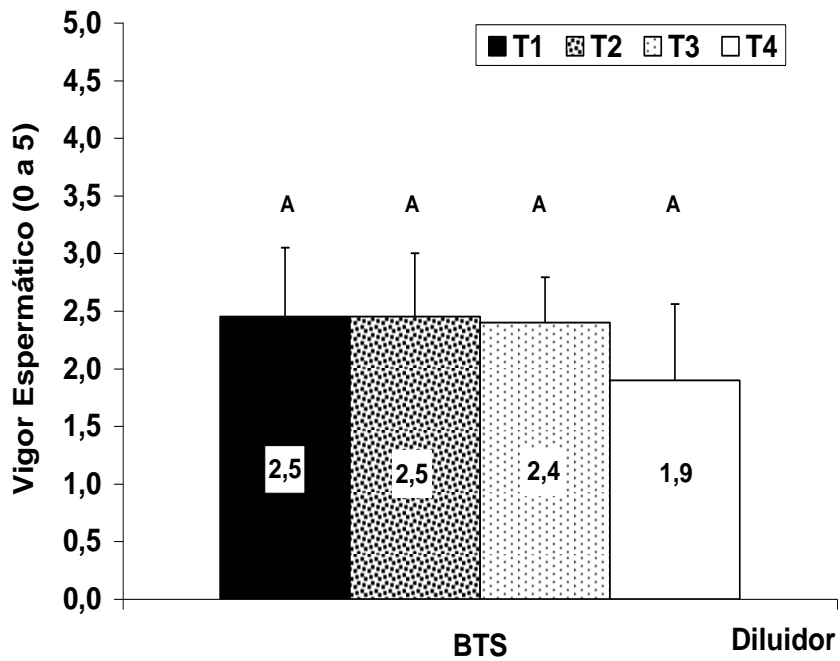


Figura 7: Vigor espermático, do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com diferentes crioprotetores, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

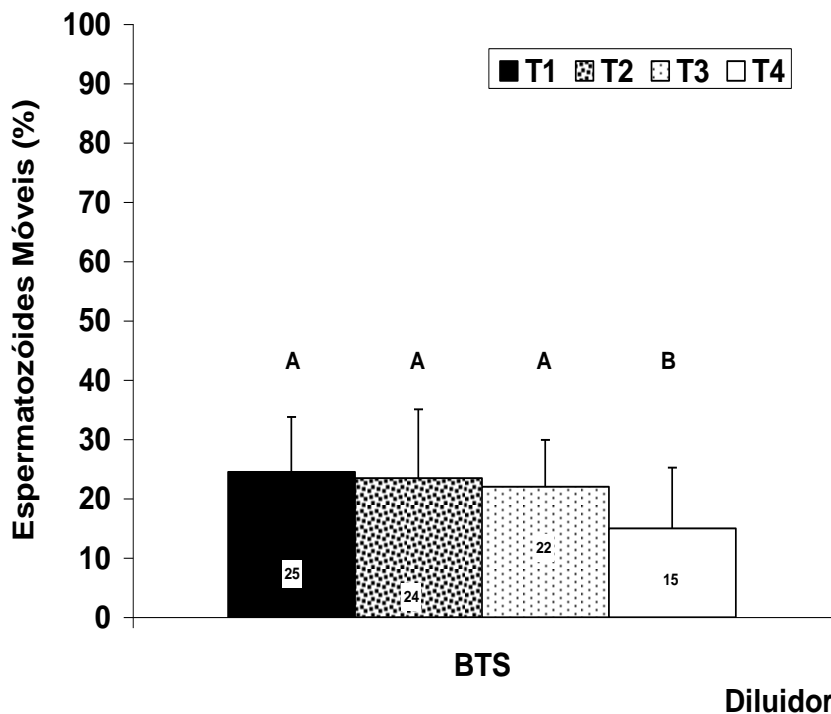


Figura 8: Porcentagem de espermatozoides móveis, do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com diferentes crioprotetores, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

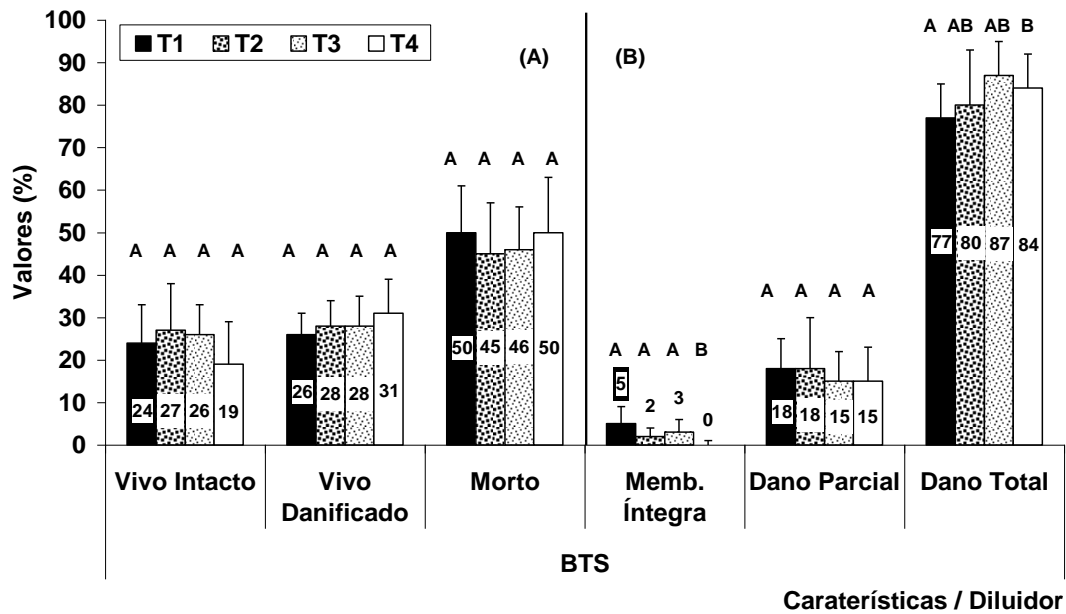


Figura 9: Vitalidade (% células vivas), integridade acrossomal (A) e de membrana do espermatozoide (B), do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com diferentes crioprotetores, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

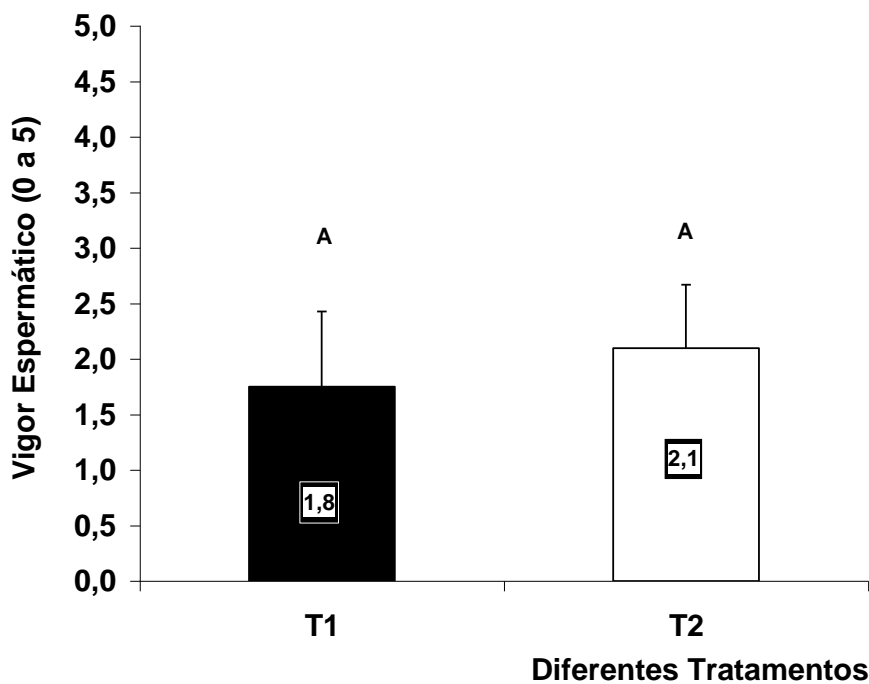


Figura 10: Vigor espermático, do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com uso da gema de ovo em pó, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

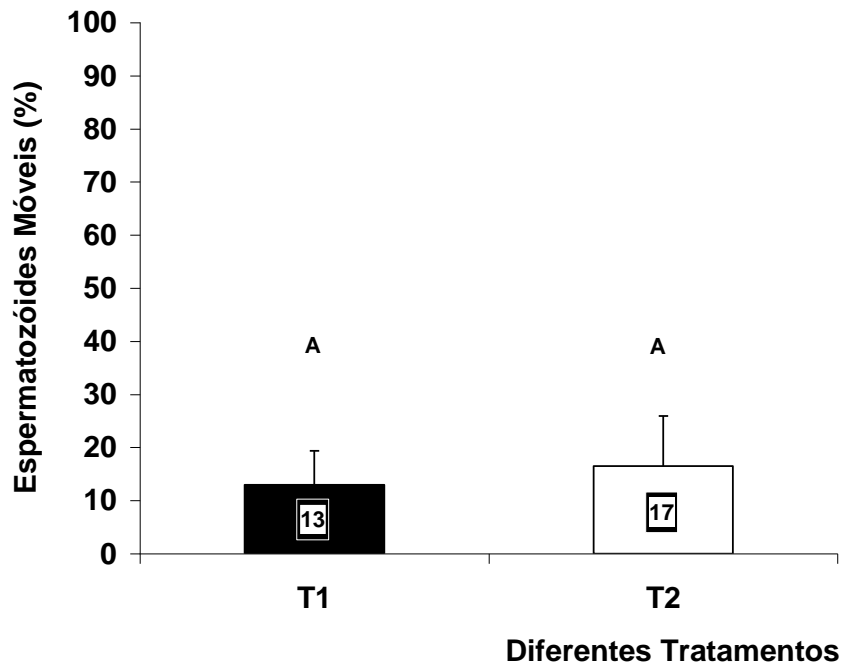


Figura 11: Porcentagem de espermatozoides móveis, do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com uso da gema de ovo em pó, após descongelação e ressuspensão do sêmen em BTS.

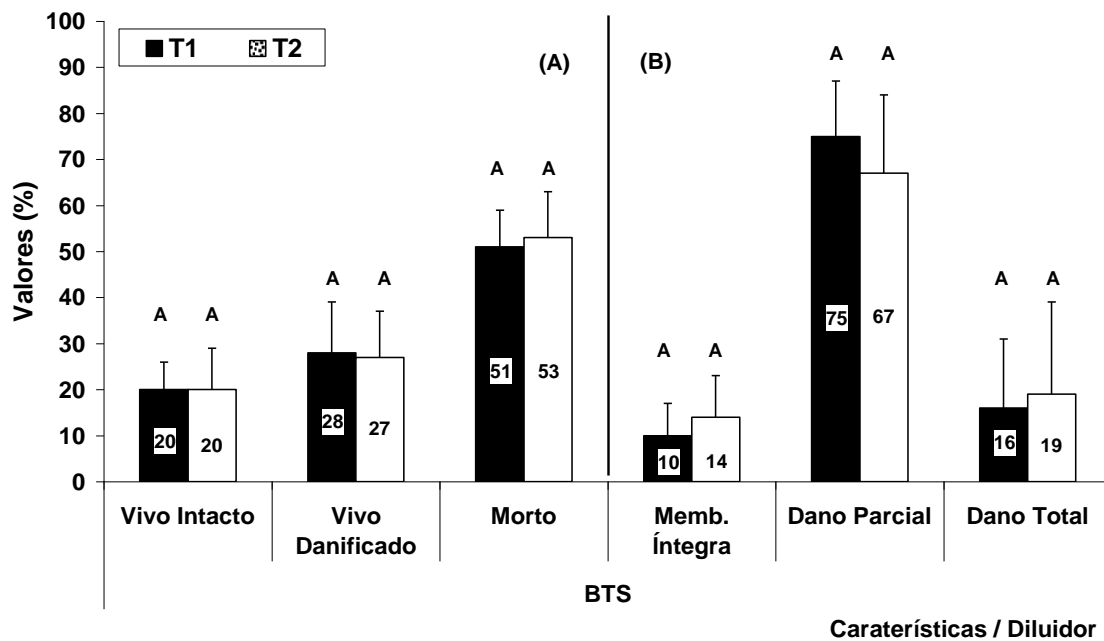


Figura 12: Vitalidade (% células vivas), integridade acrossomal (A) e de membrana do espermatozoide (B), do sêmen suíno congelado no diluente gema de ovo/glicose com uso da gema de ovo em pó, após ressuspensão no BTS.

## CONCLUSÕES

Os melhores valores de motilidade espermática no tratamento 2, sugerem que esta relação diluente x sêmen poderá ser a melhor para a congelação do sêmen. Com relação ao tipo de açúcar, o uso da glicose ou da frutose no diluente de congelação, poderá proporcionar uma melhor qualidade espermática após descongelação. O uso do óleo vegetal como crioprotetor é desaconselhável, podendo ser mantido o uso do glicerol como crioprotetor do sêmen do varrão. A utilização da gema de ovo em pó poderá trazer apenas vantagens sanitária para o sêmen congelado.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ajuda do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, da Granja Suinícola Estiva por ceder os animais e instalações e ao Dr. José Ferreira Nunes do NIB/UECE pelo fornecimento da ACP-103<sup>®</sup>, sem as quais esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMLID, T., JOHNSON, L.A., Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol 172 addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science*. v.66, p.2899-2905, 1988.

ANTUNES, R.C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.60-63, 2007.

BARRETO, M.A.P.; SILVA, J.F.S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J.R.C.; SOUZA, G.V. de; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.12, p.2115-2119, 2008.

BATHAGATE, R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Studies on the effect of

supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on *in vitro* post-thaw sperm quality. *Reproduction Domestic Animals*, v.41, p.68-73, 2006.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MADEIRA, E.M.; MASCHIO, E.F.; CORRÊA, E.K.; JUNIOR, T.L.; DESCHAMMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Crioprotetores intra e extra-celulares utilizados no congelamento do sêmen suíno. *Suínocultura Industrial*, n.9, p.32-36, 2006.

CARDOSO, R.C.S. 2005 Características *in vitro* do espermatozóiades canino criopreservado em água de coco. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 197p. (Tese de Doutorado).

FERNANDES-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; MORTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reproduction Domestic Animals*, v.41, p.114-118, 2006.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in RAM semen. *Theriogenology*, v.59, p.1241-1255, 2003.

JOHNSON, L.A., WEITZE, K.F., FISER, P. MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.143-172, 2000.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.

PENA, J.F.; JOHANNSSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrana integrity. *Theriogenology*, v.60, n.4, p.677-689, 2003.

PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. *Journal of Biological Chemistry*, v.130, p.415-423, 1939.

POLGE, C.; SALAMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical inseminations. *Veterinary Record*, v.87, p.424-428, 1970.

- ROBERTSON, L.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. 1988. The effect of incubation on membrane injury and calcium movement in ram spermatozoa subjected to cold shock. In Abstract of the 11<sup>th</sup> International Congress in Animal Science and Artificial Inseminations, Dublin, 1. pp.290.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, v.37, p.185-249, 1995.
- SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field from its use. *Journal of Dairy Science*, v.24, p.905-910, 1941.
- SCHEID, I.R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: Development and current use. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26., p.299-301, 1992.
- SARAIWA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.
- SAS Statistical Analysis System. v.6.03 Cary: SAS Institute, 1988. 1028p.
- SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S. Uma análise da inseminação artificial na suinocultura brasileira. *Suínos & Cia*, v.1, n.1, p.25-28, 2002.
- SCHMITT, F.L.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R. A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4 °C. *Acta Scientiae Veterinarie*. v.31, n.2, p.135-136, 2006.
- SCOBEY, M.J.; BIELFELD, J.S.; KRUSSEL, J.S.; JEVENDRAN, R.S. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. *Andrologia*, v.27, p.229-231, 1995.
- SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.31, n.1, p.119-127, 2009.
- SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P.; Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para a redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução animal*. v.35, n.4, p.370-384, 2011.
- TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoides de verrat: amèlioration des conditions de conservation. 1996, 91p. These (Doctorat) - Université Francois Rabelais de Tours - France, 1996. Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsi dt=182303>.
- TONIOLLI, R.; COSTA e SILVA, M.; CHAVES, R.N. Utilização de diferentes meios de ressuspensão para o sêmen do varrão após descongelação. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.16, n.1, p.41-45, 2009.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. *Reproductive Biology*, v.1, p.283-350, 1979.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2007.
- WOLDERS, H.; TEN NAPEL, J. Semen in straws. *Pig International*, v.35, n.4, p.10-14, 2005.
- Yi, Y.J.; CHEON, Y.M.; PARK, C.S. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.29-45, 2001.