

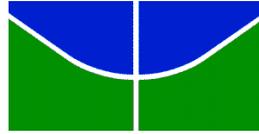
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS LOCALMENTE ADAPTADOS:
EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE CONGELAÇÃO E DILUENTES**

GILBERTO SANTOS JUNIOR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS LOCALMENTE ADAPTADOS:
EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE CONGELAÇÃO E DILUENTES**

Aluno: Gilberto Santos Junior

Orientador: Alexandre Floriani Ramos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: N°/2013

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE 2013**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SANTOS JUNIOR, G. **Criopreservação de sêmen de Suínos localmente adaptados: efeito de diferentes curvas de congelação e diluentes**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 51p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS JUNIOR, Gilberto. **Criopreservação de sêmen de Suínos localmente adaptados: efeito de diferentes curvas de congelação e diluentes**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 51p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

1.Conservação. 2. Andrologia 3.Crioprotetor

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS LOCALMENTE ADAPTADOS:
EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE CONGELAÇÃO E DILUENTES**

GILBERTO SANTOS JUNIOR

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, DOUTORADO (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (ORIENTADOR)**

**IVO PIVATO, DOUTORADO (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA) (EXAMINADOR
INTERNO)**

**MARIA DO SOCORRO MAUES ALBUQUERQUE (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 20 de Novembro de 2013

Aos meus pais, Gilberto e Sandra, às minhas irmãs, Daniella e Izabella que sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando desde o início da caminhada com conselhos e atitudes que fizeram toda a diferença. À minha namorada e companheira Carolyn pelo amor, apoio e amizade dedicada em momentos decisivos, sendo uma das grandes conquistas dessa etapa.

Com muito amor eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sem dúvidas é a razão do meu sucesso e realizações em todos os sentidos de minha vida.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Floriani Ramos, pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência e ensinamentos. Declaro aqui minha admiração pelo seu exemplo de Médico Veterinário e Pesquisador.

Agradeço aos professores e profissionais que me deram força e acrescentaram muito na minha formação profissional.

À mestranda Paula Lorena Grangeiro Souto, pela ajuda durante a execução da parte prática do trabalho e pela amizade.

Ao amigo e técnico do laboratório Normandes, pelo apoio, ajuda na execução da parte prática do trabalho e ensinamentos.

Aos amigos Eleonora, José Felipe, Carolle, Mateus, Heitor, Oscar, Nathalia, Anelise, Andrei e Rodrigo pelas discussões acadêmicas, pela amizade, apoio, companheirismo, preocupação, conselhos, comemorações e por me ajudarem a crescer pessoal e profissionalmente.

Aos funcionários da EMBRAPA campo experimental Sucupira, “Rambinho”, “Seu Zequinha”, “Seu Arlindo”, “Dona Lia”, “Dona Mara”, “Mineiro”, Weber, Manoel, Expedito, “Pelé” e todos os outros que fizeram parte da minha vida durante este trabalho e pela amizade.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte ao trabalho realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo.

À Universidade de Brasília (UnB), em especial ao programa de Pós Graduação em Ciências Animais.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE SÍBOLOS E ABREVIACÕES	XIV
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivo Geral	4
1.2 Objetivos Específicos.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Conservação de recursos genéticos de suínos localmente adaptados	5
2.2 Cenário da utilização do sêmen suíno congelado	7
2.3 Influência e utilização das curvas de congelação e crioprotetores na qualidade do sêmen.	8
2.4 Métodos de avaliação relacionadas ao sêmen suíno	9
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
CAPÍTULO 2	
1 RESUMO	177
2 ABSTRACT	188
3 INTRODUÇÃO.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	211
4.1 Local e época do Experimento	22
4.2 Coleta e análise do sêmem	222
4.3 Experimento 1: efeito do tempo de estabilização em BTS previamente ao início da curva de refrigeração sobre a qualidade do sêmen após a congelação.....	244
4.4 Experimento 2: efeito da concentração e tempo de interação do glicerol sobre a qualidade do sêmen congelado.....	255
4.5 Descongelação do sêmen	26
4.6 Análise estatística.....	266
5 RESULTADOS	277
5.1 Experimento 1: efeito do tempo de estabilização em BTS previamente ao início da curva de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado.....	277
5.2 Experimento 2: efeito da concentração e tempo de interação do glicerol sobre a qualidade do sêmen congelado.....	288

6 DISCUSSÃO.....	300
6.1 Experimento 1: Avaliação do efeito do tempo de estabilização em BTS no sêmen após o congelamento.....	30
5.2 Experimento 2: Avaliação do efeito da concentração de glicerol e do tempo de interação com sêmen sobre os resultados pós congelamento	322
7 CONCLUSÃO.....	344
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	355

RESUMO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS LOCALMENTE ADAPTADOS: EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE CONGELAÇÃO E DILUENTES

Gilberto Santos Junior¹, Alexandre Floriani Ramos².

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, Brasília-DF, ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Estudos relacionados à criopreservação de germoplasma de raças localmente adaptadas, visam disponibilizar esse material com custo reduzido e maior variabilidade genética. O objetivo desse estudo foi testar protocolos de criopreservação do sêmen que resultassem em um produto de melhor qualidade. Para cada experimento, foram coletados quatro ejaculados de quatro suínos localmente adaptados, com intervalos de 5 a 7 dias. No primeiro experimento foram testados três curvas de congelação: 0h, 2h e 4h de estabilização em BTS após coleta à temperatura de 22-24°C. Foi observado que a estabilização por duas horas resultou em melhor qualidade de sêmen pós congelação ($P > 0,05$) para os parâmetros motilidade total ($14,3 \pm 6,3\%^C$ vs $29,7 \pm 6,1\%^A$ vs $22,9 \pm 8,2\%^B$, respectivamente) e percentual de células com membrana celular e acrossoma íntegros ($9,6 \pm 4,2\%^B$ vs $17,5 \pm 4,7\%^A$ vs $12,9 \pm 6,8\%^A$). No segundo experimento, foram testados protocolos utilizando diluentes de 2% e 3% de glicerol no volume final, sem e com (quinze minutos) estabilização pré congelação. Os resultados obtidos com diluente de congelação contendo 3% do volume final de glicerol, estabilizados por quinze minutos foram superiores ($P > 0,05$) para os parâmetros motilidade total ($28,1 \pm 5,5\%^B$ vs $31,8 \pm 5,0\%^{AB}$ vs $29,1 \pm 4,9\%^B$ vs $37,9 \pm 5,4\%^A$) e percentual de células com membrana celular e

acrossomal íntegras ($15,1 \pm 5,0^C$ vs $18,4 \pm 5,7^{BC}$ vs $19,8 \pm 6,4^B$ vs $25,1 \pm 5,3^A$). Os protocolos cujo sêmen foi submetido à estabilização em BTS por duas horas e com concentração final de glicerol a 3% resultaram em sêmen de melhor qualidade ao final do processo de criopreservação.

Palavras chaves: conservação, andrologia, crioprotetor

ABSTRACT

SPERM CRYOPRESERVATION OF NATIONAL SWINE BREEDS: THE EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING CURVES AND DILUENTS

Gilberto Santos Junior¹, Alexandre Floriani Ramos².

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology

Studies related to germplasm cryopreservation of locally adapted breeds, aim to eventually reduce cost and gain genetic variability. The aim of this study was to test sperm cryopreservation protocols that could lead to greater quality results after the cryopreservation process. Four ejaculates were collected by intervals of 5-7 days, from four national swine. The first experiment tested three freezing curves: after collected, semen were equilibrated for 0h, 2h and 4h in BTS at a temperature of 22-24 ° C. It was noted that the two hour equilibration resulted in greater semen quality after freezing ($P > 0.05$) for total motility ($14.3 \pm 6.3\%^C$ vs $29.7 \pm 6.1\%^A$ vs $22.9 \pm 8.18\%^B$, respectively) and percentage of cells with membrane and acrosome integrity ($9.6 \pm 4.2\%^B$ vs $17.5 \pm 4.7\%^A$ vs $12.9 \pm 6.8\%^A$). The second experiment tested protocols using liquid storages with 2% and 3% of glycerol in the final volume, with and without fifteen minutes of pre freezing equilibration. The results obtained with the liquid storage that contained 3% of glycerol in the final volume, equilibrated for fifteen minutes, were superior ($P > 0.05$) for total motility ($28.1 \pm 5.5\%^B$ vs $31.8 \pm 5.0\%^{AB}$ vs $29.1 \pm 4.9\%^B$ vs $37.9 \pm 5.4\%^A$) and percentage of cells with membrane and acrosome integrity ($15.1 \pm 5.0\%^C$ vs $18.4 \pm 5.7\%^{BC}$ vs $19.8 \pm 6.4\%^B$ vs $25.1 \pm 5.3\%^A$). Protocols in which semen were submitted to a two hour

equilibration in BTS and a final glycerol concentration of 3%, resulted in greater semen quality by the end of the cryopreservation process.

key words: andrology, conservation, cryoprotectant

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Capítulo 2		
Tabela 1	Qualidade do sêmen criopreservado com protocolos contendo zero, duas ou quatro horas de estabilização em BTS previamente ao início da curva de refrigeração	29
Tabela 2	Qualidade do sêmen criopreservado com tratamentos contendo diluentes com 2 ou 3% de glicerol, sem e com (quinze minutos) estabilização pré congelamento	31

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- ≤ – Menor ou igual
% – Porcentagem
°C – Graus Celsius
μL – microlitro
BTS – Beltsville Thawing Solution
C-FDA – Diacetato de Carboxifluoresceína
DC – Diluente de congelação
DC1 – Diluente de congelação com 4% de glicerol
DC2 – Diluente de congelação com 6% de glicerol
DF – Distrito Federal
DR – Diluente de refrigeração
FITC-PNA - isotiocianato de fluoresceína
FR – Fração Rica
IP – iodeto de propídio
MI – membrana íntegra
MAI – membrana íntegra com acrossoma íntegro
MIAR – membrana íntegra com acrossoma reagido
mL – mililitro
MR – membrana reagida
MRAI – membrana reagida com acrossoma íntegro
MRAR – membrana reagida com acrossoma reagido
n° – Número
P – Probabilidade de erro
S – sul
Sptz – espermatozoide
UI – Unidades Internacionais
W – Oeste
% – Porcentagem
TRAT.2GLI – Tratamento com 2% de glicerol sem estabilização pré congelação
TRAT.2GLI-EST – Tratamento com 2% de glicerol com estabilização por 15 minutos.
TRAT.3GLI – Tratamento com 3% de glicerol sem estabilização pré congelação
TRAT.3GLI-EST - Tratamento com 2% de glicerol com estabilização por 15 minutos.
TRAT.0H-BTS – Tratamento sem estabilização em BTS
TRAT.2H-BTS – Tratamento com estabilização em BTS por 2 horas em temperaturas entre 22-24°C
TRAT.4H-BTS – Tratamento com estabilização em BTS por 4 horas em temperaturas entre 22-24°C
SISCAL – Sistema de criação ao ar livre
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
CASA – Computer Assisted Semen Anlysis
CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Há mais de dez anos o Brasil se mantém na quarta colocação mundial em tamanho de rebanho e produção de carne suína, com uma estimativa de 41,9 milhões de cabeças no ano de 2012, sendo que desse total aproximadamente 7% são matrizes (Anualpec, 2012). A competitividade do produto nacional é alcançada através da aplicação de tecnologias e da melhoria constante no potencial genético dos animais, e principalmente, introdução de genótipos exóticos, promovendo uma revolução na produção industrial de carne suína nas diferentes regiões do país. Com a introdução de raças especializadas, grande parte do rebanho suíno nacional é composto por animais com graus de mestiçagem diferentes, levando, praticamente, à extinção dos suínos localmente adaptados.

Tendo em vista que o mercado consumidor valoriza cada vez mais produtos oriundos de sistemas sustentáveis, e principalmente quando se trata de animais, que sejam manejados da melhor forma a manter o bem estar, reduzindo o estresse de criação, é gerada uma oportunidade para que em um futuro próximo esse recurso genético seja utilizado para obtenção de animais mais rústicos e adaptados a sistemas de criação ao ar livre (SISCAL).

A carne de raças localmente adaptadas possuem características organolépticas particulares. Isso se dá devido à seleção natural pela qual passaram durante vários séculos, permitindo que sejam criados em sistemas extensivos. Com isso, os suínos localmente adaptados muito têm a acrescentar produtivamente, proporcionando equilíbrio entre rusticidade e produtividade.

A conservação desse material genético pelo método *ex situ in vitro* em bancos de germoplasma é fundamental, pois o tornará disponível em longo prazo e custo reduzido, sem riscos inerentes a manutenção dos animais vivos, assegurando que essas raças possam ser utilizadas em criações no futuro através de ferramentas de reprodução assistida.

Das mais de 65.000 doses de sêmen estocadas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal somente 607 são de suínos, e de uma única raça, a Moura. Considerando que, em sua maioria, os grupamentos genéticos de suínos localmente adaptados se encontram em risco de extinção, torna-se imprescindível a adaptação e utilização da técnica de criopreservação de sêmen para assegurar a conservação das raças de suínos localmente adaptados (Mariante *et al.*, 2011).

Comercialmente a criopreservação de sêmen suíno é pouco utilizada devido às características fisiológicas da espécie e dificuldades encontradas na execução da técnica. O suíno tem por característica apresentar puberdade precoce, alta prolificidade e curto período entre partos, possibilitando maior pressão de seleção em menor intervalo entre gerações quando comparado às outras espécies domésticas. Outro fator limitante, é que em estudos atuais relacionados à congelação de sêmen suíno, apresentam resultados insatisfatórios quando comparado ao sêmen resfriado. Isso se dá devido às características estruturais do sêmen, que comprometem o processo de congelação e fatores limitantes existentes na técnica de inseminação.

Através de pesquisas realizadas nos últimos 40 anos, os resultados alcançados se dão através da avaliação do efeito de diferentes crioprotetores, diluentes e curvas de congelação e descongelamento (Roca, Hernandez, *et al.*, 2006).

1.1 Objetivo Geral

Comparar e estabelecer um protocolo eficiente para a criopreservação de sêmen de suínos localmente adaptados através de diferentes curvas de refrigeração, diluentes de congelamento e que utilize pequena infraestrutura laboratorial.

1.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito de estabilização do sêmen em BTS, sobre a motilidade, vigor, integridade da membrana plasmática e integridade de acrossoma após a descongelamento.

Comparar diferentes concentrações de crioprotetor intracelular (glicerol), bem como período de interação com diluente de congelamento relacionados com a motilidade e integridade da membrana plasmática no sêmen após a descongelamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação de recursos genéticos de suínos localmente adaptados

A evolução dos animais domésticos foi moldada pelo homem, sendo diretamente influenciada pelas rotas migratórias e estabelecimento nas diferentes regiões. Com a colonização da América, foram introduzidas por portugueses e espanhóis as raças suínas ibéricas, que com o passar do tempo se adaptaram às condições sanitárias, de clima e manejo disponíveis nos diferentes habitats, dando origem ao suíno nacional (Mariante & Egito, 2002).

Ao longo do tempo, houve a introdução de raças especializadas, principalmente no século XX, sendo largamente utilizadas em cruzamentos absorventes com os suínos localmente adaptados. Isso ocorreu em razão da menor produtividade dos suínos localmente adaptados, criados sob condições desfavoráveis quando comparado a forma de criação do suíno europeu. Devido à impossibilidade de criação de raças europeias nos sistemas de produção brasileiro, que em sua grande maioria era realizado de forma extensiva, o grau de mestiçagem se tornou ainda maior (Filha, 2008)

A partir desse cenário, a suinocultura brasileira pode ser dividida em três grupos: raças exóticas ou especializadas, que inclui produtos de cruzamentos e os híbridos; raças localmente adaptadas; e produtos oriundos do cruzamento exótico x raças localmente adaptadas. O primeiro grupo é constituído por animais de maior interesse comercial, visto que

são empregados níveis de tecnologia elevados para obtenção do produto que atenda à demanda do mercado consumidor. Os demais grupos são criados em condições mais extensivas, na maioria das vezes, de subsistência familiar, tendo por característica animais mais rústicos e menos produtivos (Albuquerque *et al.*, 1990).

Segundo Mariante *et al.* (2011), os suínos localmente adaptados encontram-se em risco de extinção, estando estes em sua maioria disponíveis em pequenas propriedades para produção de banha e carne para o consumo familiar.

O Brasil conta com o Programa de Conservação de Recursos Genéticos Animais, que tem como objetivo identificar as populações em adiantado estado de diluição genética, caracterizar fenotipicamente e geneticamente o germoplasma e avaliar o potencial produtivo, para que então sejam monitoradas e mantidas no programa de conservação de recurso genético com máxima viabilidade genética possível (Egito *et al.*, 2002)

Os grupamentos genéticos de suínos localmente adaptados que estão em risco de extinção são: o suíno Piau, o qual está mais concentrado na bacia do rio Parnaíba (sul de Goiás e o Triângulo Mineiro); o Nilo, de cor preta e sem cerdas; o Pirapetinga, a raça mais longilínea de todas as naturalizadas; o Canastra, do tipo ibérico, que possui, provavelmente, uma grande influência da raça portuguesa do Alentejo; o Caruncho, que apresenta pelagem semelhante ao Piau, porém de porte menor; o Canastrão, do tipo céltico, que descendem da raça portuguesa Bizarra e o suíno Moura ou Pereira, o qual originou-se provavelmente do cruzamento entre as raças Canastrão, Canastra e Duroc (Egito, 2002).

No Brasil, as raças suínas localmente adaptadas podem ser encontradas em todos os estados brasileiros, porém com número reduzido e restrito a pequenos criatórios. Existem várias metodologias utilizadas para a conservação de recursos genéticos animais: (1) conservação *in situ*, a partir da implantação de núcleos de conservação nas regiões de origem dessas raças; (2) conservação *ex situ in vivo*, na qual os animais são conservados fora de seu habitat original, ou seja, no caso das raças naturalizadas, longe do local onde foram submetidos à ação da seleção natural; e (3) conservação *ex situ in vitro*, onde o germoplasma (sêmen e embriões) é conservado através de modernas técnicas criogênicas em bancos de germoplasma.

A conservação desse material genético tem por objetivo disponibilizar em longo prazo, com custo reduzido e sem os riscos inerentes a manutenção dos animais vivos,

germoplasma de raças localmente adaptadas para serem utilizadas através de ferramentas de reprodução assistida (Mariante *et al.*, 2011).

2.2 Cenário da utilização do sêmen suíno congelado

Os primeiros trabalhos de congelação de sêmen suíno começaram na década de 1950. Vários autores (Crabo & Einarsson, 1971; Graham *et al.*, 1971) conseguiram manter um nível de fertilidade aceitável com sêmen suíno através de inseminações intracervicais. Assim como em outras espécies domésticas, o sêmen suíno criopreservado continua sendo bastante estudado, entretanto, sua utilização tem sido limitada a protocolos de melhoramento genético e enriquecimento de bancos de germoplasma (Fernandez-Gago *et al.*, 2013).

Embora a tecnologia venha sendo aprimorada, e apresentar a vantagem do armazenamento em longo prazo com custo reduzido, a biotécnica ainda não foi consolidada e aceita no meio comercial por razões econômicas, políticas, e técnicas, tendo em vista a necessidade de atingir melhores resultados (Grossfeld *et al.*, 2008).

Estudos relatam que através da associação entre inseminação artificial intrauterina profunda, monitoramento do momento exato da ovulação e utilização de sêmen congelado resultou em taxas de fertilidade que se aproximaram aos obtidos com sêmen fresco (Roca, *et al.*, 2006; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997). No entanto, a utilização de sêmen por inseminação artificial intra cervical, resultou em diminuição da taxa de parto e menor tamanho de leitegada. Estudos constataram que os resultados através da utilização de sêmen congelado são mais sensíveis a fatores ambientais e deficiências no manejo quando comparado ao sêmen fresco ou resfriado (Bolarin *et al.*, 2006; Roca *et al.*, 2006).

Os principais danos gerados durante a criopreservação de sêmen suíno foram na motilidade, danos de cromatina, alteração de membrana plasmática e lesão em membrana mitocondrial. Acredita-se que essas lesões são causadas pelo choque térmico, osmótico e dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio, injurias essas mais ofensivas às células espermáticas de suínos que de outras espécies domésticas (Green & Watson, 2001; Vadnais *et al.*, 2005).

As causas fisiológicas associadas aos resultados irregulares de fertilidade são as mudanças prematuras semelhantes à capacitação durante o processo de refrigeração (Green & Watson, 2001; Vadnais & Roberts, 2007). Essas alterações têm sido denominadas como

“criocapacitação”, que causa encurtamento do tempo de vida do espermatozoide após a descongelação devido à modificação das vias de regulação entre trocas de fluido no meio intra e extra celular, reação precoce acossômica, reação de membrana plasmática, resultando em comprometimento da população viável necessária para fecundação dos ovócitos (Vadnais & Althouse, 2011).

Além das dificuldades enfrentadas com o sêmen, existem outros fatores limitantes como: elevada concentração espermática necessária para obter uma fecundação aproveitando a prolificidade da fêmea suína, características anatômicas do trato genital da fêmea, que oferecem dificuldades adicionais aos espermatozoides para alcançar o oviduto, e a necessidade de ajustar o momento da inseminação ao período de ovulação (Steverink *et al.*, 1999).

Devido às diferenças citadas acima, protocolos apropriados para a congelação de sêmen suíno tiveram que ser testados e desenvolvidos nos últimos anos. No desenvolvimento desses protocolos se faz necessário avaliar a interação entre a concentração de crioprotetor utilizado e as velocidades de congelação/descongelação, que sabidamente devem ser otimizadas em conjunto, respeitando à complexidade bioquímica da membrana plasmática do espermatozoide, a interação de seus componentes e a influência da temperatura nessas interações (Malo *et al.*, 2012).

2.3 Influência e utilização das curvas de congelação e crioprotetores na qualidade do sêmen.

Os danos físico-químicos da congelação que ocorrem durante a manipulação, criopreservação e estocagem são irreversíveis, levando a alterações na estrutura da membrana espermática como: aumento da 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. Essas alterações se assemelham às do processo de capacitação, que ocorre fisiologicamente no ato da fecundação (Charalambopoulou *et al.*, 2000; Green & Watson, 2001).

É conhecido que a curva de congelação e a concentração de crioprotetores permeáveis e não permeáveis adotados irão refletir de forma direta na qualidade do sêmen criopreservado (Grossfeld *et al.*, 2008).

Com objetivo de reduzir os prejuízos celulares, é desejado que ocorra uma taxa de desidratação celular por osmose através da utilização de sais no meio extra celular, impedindo a formação de cristais de gelo quando submetido à temperaturas abaixo de zero. Por tanto, a velocidade de congelação deve ser otimizada, ou seja, lenta o suficiente para impedir a formação de gelo intracelular e rápida o suficiente para minimizar o choque osmótico (Anzar *et al.*, 2011).

Com isso, na criopreservação de sêmen suíno em particular, é preciso trabalhar com diluente de refrigeração e diluente de congelação, diferenciados pelo aumento da osmolaridade devido à presença do crioprotetor. Um dos fatores que vai de encontro a esse processo é a grande sensibilidade dos espermatozoides suínos a temperaturas inferiores a 15°C, necessitando um tempo mínimo de equilíbrio acima dessa temperatura, para que haja redução dos efeitos deletérios do choque térmico (Haugan *et al.*, 2005).

Outro fator limitante é o crioprotetor utilizado. Segundo Borges *et al.* (2009), o glicerol se mostrou melhor para sêmen de suínos, mas sua concentração não pode exceder 6% devido a toxicidade química e osmótica do mesmo, recomendando a concentração de 3 a 4% como ideal, confirmado por pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (Purdy *et al.*, 2010).

A partir das particularidades citadas acima, o desenvolvimento de protocolos para avaliar a interação entre a concentração de crioprotetor e velocidades de congelação/descongelação, devem ser otimizadas em conjunto, respeitando à complexidade bioquímica da membrana plasmática do espermatozoide, a interação de seus componentes e a influência da temperatura nessas interações (Wu *et al.*, 2013).

2.4 Métodos de avaliação relacionadas ao sêmen suíno

As avaliações laboratoriais do sêmen incluem aspectos macroscópicos e microscópicos (Varner, 2008). Dentre as avaliações macroscópicas, estão incluídos volume, cor e aspecto, e nas microscópicas, a motilidade, morfologia espermática, vigor, concentração, integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal (Arruda, 2003; Graham e Graham, 1990; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997).

A motilidade diz respeito ao percentual de espermatozoides móveis em uma amostra, e o vigor refere-se à força de deslocamento medido em uma escala de (0 a 5), onde

zero significa espermatozoides sem motilidade, cinco espermatozoides com deslocamento rápido e contínua progressão retilínea. Para mensuração desses parâmetros, podem ser utilizadas metodologias subjetivas ou computadorizadas, através de microscopia óptica em aumento de 100 a 400 vezes ou com equipamento CASA (Computer Assisted Semen Analysis) respectivamente (Manual..., 1998). A mensuração da motilidade dos espermatozoides pode ser influenciada por condições ambientais como calor ou frio excessivo, uso de lubrificantes ou desinfetantes e luz, demandando proteção do sêmen à essas injúrias (Varner, 2008).

A concentração representa o número de espermatozoides por centímetro cúbico, sendo que o procedimento mais comum para contagem das células é através de câmara de Neubauer, podendo ainda ser utilizada a espectrofotometria e o *Micro-cell-counter* (Manual..., 1998). Esse parâmetro possui variação individual dos animais, podendo ser influenciado pela espécie, raça ou até mesmo regime de coleta dos animais (Vidament *et al.*, 1997).

A caracterização morfológica das células de um ejaculado é um parâmetro utilizado na triagem de problemas e sua respectiva frequência. Para mensuração dessas características, podem ser utilizados esfregaços corados ou preparação úmida avaliados em microscópio de contraste de fase (Manual..., 1998).

A avaliação de integridade de membranas é um exame complementar que proporciona maior subsídio relacionado à qualidade celular, visto que uma membrana íntacta e funcionalmente ativa é requerida para o metabolismo espermático, capacitação, reação do acrossoma, ligação e penetração no ovócito (Brito *et al.*, 2003).

O uso de sondas fluorescentes para DNA, enzimas intracitoplasmáticas ou mesmo potencial de membrana foram desenvolvidos e testados proporcionando avaliação de funcionalidade do espermatozoide pós descongelamento (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997). Para avaliação da integridade de membrana plasmática, o iodeto de propídeo (IP) é o mais utilizado devido à facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e precisão na avaliação (Graham & Graham, 1990). Por ser um fluorocromo de alta densidade impermeável à membrana plasmática, se liga somente ao DNA de espermatozoides cuja membrana se encontra danificada, corando o núcleo de vermelho (Garner e Johnson, 1995).

A associação de IP com 6-carboxifluoresceína (C-FDA) vem sendo amplamente utilizada, pois é um fluorocromo que penetra rapidamente a membrana plasmática intacta, sofrendo hidrolização por esterases no interior da célula, resultando em 6-carboxifluoresceína livre, altamente fluorescente, o qual se torna impermeável à membrana íntegra, sinalizando células com membrana plasmática íntegra com a coloração verde (Garner *et al.*, 1994).

Além da avaliação da membrana plasmática, a reação acrossomal também é um importante parâmetro a ser medido, pois indica reação precoces inerente ao processo de capacitação (Perez *et al.*, 1996). Para essa avaliação, a utilização de lecitinas conjugadas pode ser utilizada. Essas lectinas conjugadas se ligam a glucose, manose, galactose e N-acetilglucosamina ou outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma. A lectina *Arachis hypogaea* (*peanut*; PNA) se mostrou eficiente na avaliação de células espermáticas na espécie suína, porém para sua visualização em microscopia de epifluorescência, deve ser conjugada a fluoresceínas como o isoticianato de fluoresceína (FITC) (Baker *et al.*, 2004). Em células com reação acrossomal ou acrossoma danificado, essas lecitinas serão capazes de permear, e o PNA se ligara a glicoproteínas da membrana acrossomal. Em células sem reação acrossomal, será observada coloração verde na região de acrossoma reagido, enquanto para células fixadas e permeabilizadas, o acrossoma não reagirá à coloração fluorescente, sendo consideradas intactas (Silva & Gadella, 2006).

Para utilização dos ejaculados visando o processo de congelação, é necessário que as características seminais estejam dentro dos parâmetros mínimos requeridos para espécie suína, isto é, motilidade espermática maior que 80% e morfologia espermática com menos de 20% de defeitos totais (Manual..., 1998).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBURQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A.S.; CASTRO, S.T.R.; TROVO, J.B.F. Identificação e caracterização de grupamentos de suínos nacionais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1990.
- ANUALPEC. Anuário estatístico da pecuária de corte. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., p. 115-138, 2012.
- ANZAR, M.; KROETSCH, T.; BOSWALL, L. Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. *Animal Reproduction Science*, v. 126, n. 1-2, p. 23-31, Jun 2011.
- ARRUDA, R. P. B., B.A.; GRAVENCE, C.G; LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, p. 228-229, 2003.
- BAKER, S. S. T., M.; THALER, C.D. . Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *Journal of Andrology*, v. 25, p. 744-751, 2004.
- BOLARIN, A; ROCA, J.; RODRÍGUES-MARTÍNES, H.; HERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology*, v. 65, n. 3, p. 669-80, Feb 2006.
- BORGES, E. N.; SILVA, R.C.; FUTINO, D.O.; ROCHA-JUNIOR, C.M.; AMORIM, C.A.; BÃO, S.N.; LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*, v. 59, n. 2, p. 195-200, Oct 2009.
- BRITO, L. F.; BARTH, A.D., BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v. 60, n. 8, p. 1539-51, Nov 2003.

- CASTRO, S. T. R. Produção orgânica de suínos poderá usar raças naturalizadas em risco de extinção. *SOS Suino*, 2004.
- CHARALAMBOPOULOU, G. C.; KARAMERTZANIS, P.; KIKKINIDES, E.S.; STUBOS, A.K.; KANELLOPOULOS, N.K.; PAPAIOANNOU, A.T. A study on structural and diffusion properties of porcine stratum corneum based on very small angle neutron scattering data. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 9, p. 1085-91, Sep 2000.
- CRABO, B.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 12, n. 1, p. 125-7, 1971.
- EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Archivos de zootecnia*, v. 51, p. 193-194, 2002.
- FERNANDEZ-GAGO, R.; DOMINGUEZ, J. C.; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. *Theriogenology*, v. 80, n. 4, p. 400-10, Sep 1 2013.
- FILHA, O. L. S. Experiências Brasileiras na criação de suínos locais. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. p. 13-15 2008.
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLAND, R.P; Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal Andrology*, v. 15, n. 6, p. 620-9, Nov-Dec 1994.
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology Reproduction*, v. 53, n. 2, p. 276-84, Aug 1995.
- GRAHAM, E. F. et al. Some chemical studies of the female reproductive tract and seminal plasma of the male turkey and their relationship to fertility. *Poult Science*, v. 50, n. 4, p. 1170-81, Jul 1971.
- GRAHAM, E. F.; GRAHAM, J. K. The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and the fertility of bovine semen. *Journal Dairy Science*, v. 73, n. 1, p. 91-7, Jan 1990.
- GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 889-98, Dec 2001.
- GROSSFELD,
R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C., FRENZEL, A.; MAXWELL, W.M.; RATH, D.
New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1225-33, Nov 2008.
- HAUGAN, T. REKSEN O, GRÖHN YT, GAUSTAD AH, HOFMO PO.. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology*, v. 64, n. 4, p. 891-901, Sep 1 2005.
- MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GARCIA, A.; JEREZ, R. A. Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrologia*, v. 44 Suppl 1, p. 605-10, May 2012.

- MANUAL. para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA. Belo Horizonte, 1998. 59
- MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 223-35, Jan 1 2002.
- MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; RAMOS, A.F. . Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, p. 64-68, 2011.
- PEREZ, L. J. et al. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, v. 45, n. 5, p. 1037-46, Apr 1 1996.
- PURDY, P. H. et al. Implications of the pH and temperature of diluted, cooled boar semen on fresh and frozen-thawed sperm motility characteristics. *Theriogenology*, v. 74, n. 7, p. 1304-10, Oct 15 2010.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M; CARVAJAL, G; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E.A.; Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, v. 84, n. 10, p. 2692-9, Oct 2006.
- ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; VÁZQUEZ, J. M.; BOLARÍN, A.; HERNÁNDEZ, M.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ, E.A. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. *Soc Reproduction Fertility Suppl*, v. 62, p. 261-75, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction Fertility and Development*, v. 9, n. 3, p. 297-308, 1997.
- SILVA, P. F.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, n. 5, p. 958-78, Mar 15 2006.
- STEVERINK, D. W. et al. Duration of estrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. *Journal Animal Science*, v. 77, n. 4, p. 801-9, Apr 1999.
- VADNAIS, M.L.; KIRKWOOD, R.N.; SPECHER, D.J.; CHOU, K.. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Animal Reproductin Science*, v. 90, n. 3-4, p. 347-54, Dec 2005.
- VADNAIS, M. L.; ROBERTS, K. P. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *Journal Andrology*, v. 28, n. 3, p. 416-22, May-Jun 2007.
- VADNAIS, M. L.; ALTHOUSE, G. C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, v. 76, n. 8, p. 1508-16, Nov 2011.

- VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 448-62, Aug 2008.
- VIDAMENT, M.; DUPERE AM, JULIENNE P, EVAIN A, NOUE P, PALMER E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v. 48, n. 6, p. 907-17, Oct 15 1997.
- WU, T. W. et al. The combinatorial effect of different Equex STM paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reproduction Domestic Animal*, v. 48, n. 1, p. 53-8, Feb 2013.

CAPÍTULO 2

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS LOCALMENTE ADAPTADOS: EFEITO DE DIFERENTES CURVAS DE CONGELAÇÃO E DILUENTES

RESUMO

Estudos relacionados à criopreservação de germoplasma de raças localmente adaptadas, visam disponibilizar esse material com custo reduzido e maior variabilidade genética. O objetivo desse estudo foi testar protocolos de criopreservação do sêmen que resultassem em um produto de melhor qualidade. Para cada experimento, foram coletados quatro ejaculados de quatro suínos localmente adaptados, com intervalos de 5 a 7 dias. No primeiro experimento foram testados três curvas de congelação: 0h, 2h e 4h de estabilização em BTS após coleta à temperatura de 22-24°C. Foi observado que a estabilização por duas horas resultou em melhor qualidade de sêmen pós congelação ($P>0,05$) para os parâmetros motilidade total ($14,3\pm 6,3\%^C$ vs $29,7\pm 6,1^A$ vs $22,9\pm 8,2^B$, respectivamente) e percentual de células com membrana celular e acrossoma íntegros ($9,6\pm 4,2\%^B$ vs $17,5\pm 4,7^A$ vs $12,9\pm 6,8^A$). No segundo experimento, foram testados protocolos utilizando diluentes de 2% e 3% de glicerol no volume final, sem e com (quinze minutos) estabilização pré congelação. Os resultados obtidos com diluente de congelação contendo 3% do volume final de glicerol, estabilizados por quinze minutos foram superiores ($P>0,05$) para os parâmetros motilidade total ($28,1\pm 5,5^B$ vs $31,8\pm 5,0^{AB}$ vs $29,1\pm 4,9^B$ vs $37,9\pm 5,4^A$) e percentual de células com membrana celular e acrossomal íntegras ($15,1\pm 5,0^C$ vs $18,4\pm 5,7^{BC}$ vs $19,8\pm 6,4^B$ vs $25,1\pm 5,3^A$). Os protocolos cujo sêmen foi submetido à estabilização em BTS por duas horas e com concentração final de glicerol a 3% resultaram em sêmen de melhor qualidade ao final do processo de criopreservação.

Palavras chaves: conservação, andrologia, crioprotetor

ABSTRACT

SPERM CRYOPRESERVATION IN NATIONAL SWINE BREEDS: THE EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING CURVES AND LIQUID STORAGE

Studies related to germplasm cryopreservation of locally adapted breeds, aim to eventually reduce cost and gain genetic variability. The aim of this study was to test sperm cryopreservation protocols that could lead to greater quality results after the cryopreservation process. Four ejaculates were collected by intervals of 5-7 days, from four national swine. The first experiment tested three freezing curves: after collected, semen were equilibrated for 0h, 2h and 4h in BTS at a temperature of 22-24 ° C. It was noted that the two hour equilibration resulted in greater semen quality after freezing ($P > 0.05$) for total motility ($14.3 \pm 6.3\%^C$ vs 29.7 ± 6.1^A vs 22.9 ± 8.18^B , respectively) and percentage of cells with membrane and acrosome integrity ($9.6 \pm 4.2\%^B$ vs 17.5 ± 4.7^A vs 12.9 ± 6.8^A). The second experiment tested protocols using liquid storages with 2% and 3% of glycerol in the final volume, with and without fifteen minutes of pre freezing equilibration. The results obtained with the liquid storage that contained 3% of glycerol in the final volume, equilibrated for fifteen minutes, were superior ($P > 0.05$) for total motility (28.1 ± 5.5^B vs 31.8 ± 5.0^{AB} vs 29.1 ± 4.9^B vs 37.5 ± 5.4^A) and percentage of cells with membrane and acrosome integrity (15.1 ± 5.0^C vs 18.4 ± 5.7^{BC} vs 19.8 ± 6.4^B vs 25.1 ± 5.3^A). Protocols in which semen were submitted to a two hour equilibration in BTS and a final glycerol concentration of 3%, resulted in greater semen quality by the end of the cryopreservation process.

key words: andrology, conservation, cryoprotectant

3 INTRODUÇÃO

Há mais de dez anos o Brasil se mantém na quarta colocação mundial em tamanho de rebanho e produção de carne suína, com uma estimativa de 41,9 milhões de cabeças no ano de 2012, sendo que desse total aproximadamente sete por cento são matrizes (Anualpec, 2012).

A competitividade do produto nacional é alcançada através da aplicação de tecnologias e da melhoria constante no potencial genético dos animais, e principalmente, introdução de genótipos exóticos. Esse cenário cria oportunidade à inclusão dos suínos localmente adaptados em cruzamentos, visto que possuem diferentes características organolépticas da carne, provavelmente devido às diferenças fisiológicas adquiridos pela seleção natural de séculos, estando aptos e adaptados ao clima regional, à alimentação mais simples, à doenças infecciosas e endo e ectoparasitas.

Para isso, a criopreservação de germoplasma é justificada visto que disponibilizará esse material genético à aplicação de técnicas de reprodução assistida sem que haja demanda de alocação dos poucos exemplares disponíveis.

A criopreservação do sêmen é pouco utilizada a nível comercial, porém em granjas núcleo e programas de conservação de recursos genéticos os protocolos inerentes ao processo de congelamento são estudados e aperfeiçoados visando melhoria nos resultados pós congelamento, agregando valores que resultem em melhores taxas de parto.

Através de pesquisas realizadas nos últimos 40 anos, os resultados alcançados variam com o efeito de diferentes crioprotetores, diluentes e curvas de

congelamento/descongelamento. Esses estudos, além de gerar melhorias dos protocolos, confirmam os principais limitantes relacionados à célula espermática de suínos.

Este fato demonstra a necessidade de maiores estudos da interação das variáveis de protocolos consolidados em raças comerciais aplicados aos suínos localmente adaptados, objetivando associação de crioprotetores, adaptação de curvas de refrigeração e aplicabilidade da técnica aos programas de conservação.

O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes curvas de refrigeração e diluentes de congelamento para estabelecer um protocolo eficiente e que utiliza pequena infraestrutura laboratorial para criopreservação de sêmen de suínos localmente adaptados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob protocolo UnBDOC nº150682/2012.

Foram utilizados quatro suínos localmente adaptados (Rabo de Peixe; Casco de Burro; Piau e Moura) adultos previamente submetidos à avaliação andrológica e considerados aptos para reprodução.

Todos os machos utilizados para as coletas foram alojados em baias individuais de 6m² e alimentados com ração de manutenção contendo 14% de proteína bruta. Esta alimentação foi oferecida em duas refeições (manhã e tarde) totalizando dois quilogramas, e água à vontade através de bebedouro automático do tipo chupeta.

A qualidade do ejaculado (*in natura*) foi avaliada quanto seu aspecto, volume (mL), concentração ($\times 10^6$ spz/mL), vigor espermático (0 a 5), motilidade espermática (%), morfologia (%) e integridade de membrana e de acrossoma (%).

Após avaliação e centrifugação foram utilizados os seguintes diluentes:

	DR	DC1	DC2
Frutose	32,0g	32,0g	32,0g
Dextrose, anhydrous	32,0g	32,0g	32,0g
TES-N-TRIS (hidroxymethyl)	12,0g	12,0g	12,0g
TRIS (hidroxymethyl) Aminoethane	2,0g	2,0g	2,0g
Gema de ovo	200,0mL	200,0mL	200,0mL
Penicilina	1.000IU/mL	1.000IU/mL	1.000IU/mL
Estreptomicina	1.000µg/mL	1.000µg/mL	1.000µg/mL
Água milli-q QSP	1.000mL	1.000mL	1.000mL
Glicerol	-	4%	6%

4.1 Local e época do Experimento

O estudo foi realizado, no período de janeiro a julho de 2013, no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira, pertencente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado a sudoeste da cidade de Brasília, DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02'W), com altitudes que variam de 1050 a 1250m. O clima predominante é o tropical chuvoso, indicando inverno seco e verão chuvoso. A fazenda conta com uma área total de 1.800 ha, distribuída em áreas de cerrado, pastagem e agricultura (Walter, 1998).

4.2 Coleta e análise do sêmen

Foram coletados quatro ejaculados de cada um dos quatro machos suínos localmente adaptados com intervalos de cinco a sete dias pelo método da estimulação com a mão enluvada (Hancock & Howell 1959) e auxílio de manequim fixo ao piso ou uma fêmea em estro para cada experimento. Os ejaculados foram coletados em tubo de coleta isotérmico MiniTube[®] contendo água aquecida a 50°C em um compartimento inferior e filtro na boca

para separar a fração gelatinosa do ejaculado. Somente a fração rica (FR) foi utilizada para criopreservação, o restante foi descartado.

Imediatamente após a coleta, foi adicionado ao ejaculado o BTS na proporção de 1:1 com temperatura próxima a 34°C e levado ao laboratório, para que fosse avaliado quanto a motilidade (0 a 100%) e vigor (0 a 5) através de microscopia óptica de contraste de fase em aumento de 200x. A concentração foi estimada através da utilização de câmara de Neubauer Improved, e com isso determinado o volume de ressuspensão para as etapas seguintes. A morfologia espermática foi avaliada em microscopia de contraste de fase onde foram contadas 200 espermatozoides. Somente ejaculados com motilidade e espermatozoides normais superior a 80% foram utilizados.

Foram utilizadas sondas diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídio (IP) (Molecular Probe[®], Eugene, Oregon, EUA), conforme descrito por Harrison & (Harrison e Vickers, 1990). Uma amostra de sêmen (10µl) foi adicionada à solução corante (40µl) e incubada em microtubo de polietileno de 2mL protegido da luz. Uma alíquota foi colocada em lâmina sob lamínula e observada em microscópio de epifluorescência Nikon (Eclipse Ci-S/Ci-L: filtro de comprimento de onda 520-560 nm excitação/emissão). Foram examinadas 200 células espermáticas por lâmina, sendo classificadas de acordo com a membrana plasmática em: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça); membrana lesada (presença de coloração vermelha na cabeça). Para fins de análise utilizaram-se os percentuais de espermatozoides com membrana íntegra.

A integridade de acrossoma foi avaliada utilizando uma conjugação de isoticianato de fluoresceína (FITC) com lecitina de amendoim (*peanut agglutin* – PNA) e IP, como descrito por (Klinc e Rath, 2007). Uma amostra de sêmen (10µl) foi adicionada à solução corante (40µl) e incubada em microtubo de polietileno de 2mL protegido da luz. Uma alíquota foi colocada em lâmina sob lamínula e observada em microscópio de epi

fluorescência. Foram examinadas 200 células espermáticas por lâmina, sendo classificadas em quatro categorias, sendo: morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração de acrossoma); morto com acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e no acrossoma); vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma).

4.3 Experimento 1: efeito do tempo de estabilização em BTS previamente ao início da curva de refrigeração sobre a qualidade do sêmen após a congelação

Após a coleta e avaliação do sêmen fresco, os ejaculados foram fracionados e submetido a três tratamentos:

Tratamento 0H-BTS: o ejaculado diluído em BTS foi imediatamente centrifugado a temperatura ambiente em rotação de 800G por 10 minuto. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento (pellet) ressuspendido com DR. Com a concentração espermática definida, o volume do DR foi calculado para que completasse metade do volume necessário para atingir concentração final de 400×10^6 espermatozoides por mL. O pellet ressuspendido foi mantido a 15°C por uma hora e a 5°C por duas horas. Ao fim desse período foi adicionado o DC2 com volume equivalente à fração resfriada e realizado envase em palhetas de 0,5 mL, as quais foram mantidas em vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e, posteriormente, mergulhadas em nitrogênio a -196°C.

Tratamento 2H-BTS: imediatamente após a coleta, o ejaculado foi diluído (1:1) em BTS a 34°C e mantido à temperatura assistida entre 22-24°C por duas horas. As etapas seguintes, envolvendo a centrifugação até o armazenamento das palhetas em nitrogênio líquido foram similares às descritas para o T1.

Tratamento 4H-BTS: imediatamente após a coleta, o ejaculado foi diluído (1:1) em BTS a 34°C e mantido à temperatura assistida entre 22-24°C por quatro horas. As etapas seguintes, envolvendo a centrifugação até o armazenamento das palhetas em nitrogênio líquido foram similares às descritas para o T1.

4.4 Experimento 2: efeito da concentração e tempo de interação do glicerol sobre a qualidade do sêmen congelado

O ejaculado foi diluído em BTS imediatamente após a coleta e mantido à temperatura assistida entre 22-24°C por duas horas. Ao final desse período foi centrifugado a temperatura ambiente em rotação de 800G durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (pellet) ressuscitado com DR. Com a concentração espermática definida, o volume do DR foi calculado para que completasse metade do volume necessário para atingir concentração final de 400×10^6 espermatozoides por mL. O pellet ressuscitado foi mantido a 15°C por uma hora e a 5°C por duas horas. Ao fim desse período, o sêmen foi dividido fracionado em porções iguais para que fossem realizados 4 tratamentos:

Tratamento 2GLI: foi adicionado DC1 em quantidade equivalente ao DR, envasado em palheta de 0,5 ml e levadas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e, posteriormente, mergulhadas em nitrogênio a -196°C.

Tratamento 2GLI-EST: foi adicionado DC1 em quantidade equivalente ao DR, envasado em palheta de 0,5 ml. Foi submetido a um período de estabilização de 15 minutos a 5°C para então serem levadas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e, posteriormente, mergulhadas em nitrogênio a -196°C.

Tratamento 3GLI: foi adicionado DC2 em quantidade equivalente ao DR, envasado em palheta de 0,5 ml elevadas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e, posteriormente, mergulhadas em nitrogênio a -196°C.

Tratamento 3GLI-EST: foi adicionado DC2 em quantidade equivalente ao DR, envasado em palheta de 0,5 ml. As palhetas foram submetidas a um período de estabilização de 15 minutos a 5°C para então serem levadas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e, posteriormente, mergulhadas em nitrogênio a -196°C.

4.5 Descongelamento do sêmen

A descongelamento foi realizada com intervalo de quatro a sete dias após a congelamento em temperatura de 37°C por 30 segundos em banho maria. O sêmen foi ressuspensão em BTS (1:5, v/v), atingindo concentração de 80×10^6 spz/mL e mantido por 10 minutos para posterior avaliação do sêmen conforme descrito no item 4.2.

4.6 Análise estatística

As variáveis foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Lilliefors e quanto a homoscedasticidade pelo teste de Cohan. As variáveis MT, MI, MIAI, MRAI, MRAR, que apresentaram distribuição normal e homoscedasticidade foram submetidas a análise de variância ANOVA e suas médias comparadas pelo teste de Duncan. As variáveis MIAL, MLAI, DMA, DME e DT não apresentaram distribuição normal e foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As médias entre tratamentos foram comparadas adotando-se 5% ($P \leq 0,05$) de significância. Para análise estatística dos dados dos experimentos foi utilizado o programa estatístico SAEG.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: efeito do tempo de estabilização em BTS previamente ao início da curva de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado

O tratamento com estabilização por duas horas em BTS (TRAT.2H-BTS) apresentou motilidade maior ($P < 0,05$) do que os tratamentos sem estabilização (TRAT.0H-BTS) e com quatro horas de estabilização (TRAT.4H-BTS) (Tabela 1).

O tempo de estabilização em BTS influenciou significativamente a integridade de membrana plasmática das células espermáticas (Tabela 1). Quando o sêmen não passou por período de estabilização, a porcentagem de células com membrana íntegra foi inferior aos tratamentos que utilizaram a estabilização em BTS, sendo que duas horas de estabilização promoveu maior percentual de espermatozoides com membrana íntegra.

Houve um efeito positivo ($P < 0,05$) da estabilização do sêmen em BTS quanto a integridade de acrossoma das células espermáticas (Tabela 1). Ambos os tratamentos (com duas e quatro horas de estabilização) tiveram maior proporção de espermatozoides com

acrossoma íntegro, tanto em células com membrana íntegra quanto com membrana lesada, quando comparado ao protocolo sem estabilização.

Os tratamentos aplicados ao processo de congelamento não influenciaram ($P>0,05$) a morfologia e vigor das células espermáticas (Tabela 1).

Tabela 1 – Qualidade do sêmen criopreservado com protocolos contendo zero, duas ou quatro horas de estabilização em BTS previamente ao início da curva de refrigeração

	FRESCO	TRAT.0H-BTS	TRAT.2H-BTS	TRAT.4H-BTS
Avaliação física				
Motilidade Total (%)	82,3±6,1	14,3±6,3 ^C	29,7±6,1 ^A	22,9±8,2 ^B
Vigor (0-5)	3,01±0,54	1,56±0,97	1,86±1,13	1,83±1,12
Avaliação CFDA				
MI (%)	89,1±4,7	8,5±6,1 ^C	17,2±4,1 ^A	13,1±5,3 ^B
MR (%)	11,0±4,7	91,5±6,1	83,4±5,0	89,9±5,3
Avaliação FITC-PNA				
MIAI (%)	87,1±8,1	9,6±4,2 ^B	17,5±4,7 ^A	12,9±6,8 ^A
MIAR (%)	0,1±0,2	0,9±0,04	1,1±1,3	0,9±1,3
MRAI (%)	11,6±7,3	19,7±6,1 ^B	22,8±5,1 ^A	21,8±6,9 ^A
MRAR (%)	1,3±1,0	69,8±7,0 ^A	58,6±8,4 ^B	64,5±11,8 ^{AB}
Morfologia espermática				
Defeitos menores (%)	16,3±6,7	13,3±7,3	12,7±8,3	15,8±9,5
Defeitos maiores (%)	5,3±2,3	10,4±7,3	9,1±8,7	7,8±7,8
Defeitos totais (%)	21,6±7,6	23,7±7,5	21,8±10,3	23,6±11,6

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P\leq 0,05$)

5.2 Experimento 2: efeito da concentração e tempo de interação do glicerol sobre a qualidade do sêmen congelado

O tratamento contendo 3% de glicerol no volume final, associado a estabilização por 15 minutos previamente a criopreservação (TRAT.3GLI-EST) apresentou maior ($P<0,05$) percentual de células móveis do que os tratamentos contendo 2 ou 3% de glicerol no volume final e não submetidos a estabilização por 15 minutos previamente a criopreservação (TRAT.2GLI e TRAT.3GLI) (Tabela 2).

O TRAT.3GLI-EST apresentou maior ($P<0,05$) proporção de espermatozoides com membrana íntegra do que os demais tratamentos.

A concentração de glicerol no diluente e o período de estabilização influenciaram ($P<0,05$) a integridade de acrossoma das células espermáticas. O tratamento contendo 3% de glicerol e submetido a estabilização por 15 minutos (TRAT.3GLI-EST) aumentou a proporção de espermatozoides com membrana e acrossoma íntegro, enquanto que o tratamento contendo 2% de glicerol sem estabilização (TRAT.2GLI) alcançou os menores resultados (Tabela 2).

A concentração de glicerol e o tempo de estabilização não influenciaram a morfologia e vigor das células espermáticas.

Tabela 2: Qualidade do sêmen criopreservado com tratamentos contendo diluentes com 2 ou 3% de glicerol, sem e com (quinze minutos) estabilização pré congelação

	TRAT.2GLI	TRAT.2GLI-EST	TRAT.3GLI	TRAT.3GLI-EST
Avaliação física				
Motilidade Total (%)	28,1±5,5 ^B	31,8±5,0 ^{AB}	29,1±4,9 ^B	37,5±5,4 ^A
Vigor (0-5)	2,59±0,42	2,50±0,25	2,71±0,33	2,70±0,32
Avaliação CFDA				
MI (%)	16,1±5,4 ^B	20,4±7,6 ^B	18,5±3,8 ^B	25,4±6,9 ^A
MR (%)	83,9±5,4 ^A	79,6±7,6 ^A	81,5±3,8 ^A	74,6±6,9 ^B
Avaliação FITC-PNA				
MIAI (%)	15,1±5,0 ^C	18,4±5,7 ^{BC}	19,8±6,4 ^B	25,1±5,3 ^A
MIAR (%)	0,0±0,0	0,1±0,2	0,1±0,5	0,1±0,5
MRAI (%)	26,2±9,0	29,1±14,7	23,1±3,5	25,1±5,3
MRAR (%)	58,7±9,8	52,4±18,5	56,9±8,2	49,7±10,4
Morfologia espermática				
Defeitos menores (%)	14,9±6,6	15,4±6,9	13,0±5,4	14,3±6,6
Defeitos maiores (%)	5,6±2,9	6,4±3,9	5,7±2,4	6,5±3,5
Defeitos totais (%)	20,5±6,1	21,8±7,6	18,7±4,7	20,8±6,5

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P\leq 0,05$)

6 DISCUSSÃO

6.1 Experimento 1: Avaliação do efeito do tempo de estabilização em BTS no sêmen após o congelamento.

A criopreservação de sêmen é um instrumento indispensável para o estabelecimento de bancos de germoplasma animal (Kong *et al.*, 2012). As metodologias adotadas para criopreservação de sêmen suíno, geralmente resultam em mais de 50% de células mortas após o processo de congelamento-descongelamento (Eriksson *et al.*, 2001). De acordo com Huang *et al.* (2001), há uma grande perda da viabilidade espermática durante o processo de congelamento/descongelamento e pequenos prejuízos inerentes ao processo de refrigeração.

Os resultados de motilidade total do sêmen após a diluição em BTS (Tabela 1) foram semelhantes aos encontrados por (Barros *et al.*, 2012) (83,4%), (Silva *et al.*, 2013) (81,7%) e (Parrilla *et al.*, 2012) (88,8%). A sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo de congelamento/descongelamento foi evidenciada quando observada a redução da motilidade e viabilidade espermática após congelamento em todos os protocolos utilizados quando comparado com o sêmen fresco. As diferenças encontradas, segundo (Selles *et al.*, 2003) podem ser explicadas por mudanças estruturais e funcionais provocadas pelo processo de criopreservação. Diferenças na bicamada lipídica da membrana como menor porcentagem de moléculas de colesterol e sua distribuição de maneira assimétrica, além de diferenças na composição dos ácidos graxos de fosfolípidios que possuem número reduzido de ligações do tipo *cis*, poderiam explicar a maior susceptibilidade ao choque gerado pela congelamento (Blanch *et al.*, 2012; Gomez-Fernandez *et al.*, 2012).

O período de equilíbrio adotado, caracterizado pela redução lenta de temperatura após a coleta, tem por objetivo reduzir os efeitos deletérios inerentes ao choque térmico (Medrano *et al.*, 2009). Neste estudo, a ausência do equilíbrio no TRAT.0H-BTS afetou negativamente os parâmetros avaliados. Foram observados comprometimento ($P \leq 0,05$) na motilidade total, integridade de membrana celular e acrossomal se comparados aos protocolos com adoção de tempo de estabilização em BTS. Os melhores resultados alcançados quanto a motilidade total no TRAT.2H-BTS e quanto a integridade de membrana e de acrossoma nos TRAT.2H-BTS e TRAT.4H-BTS mostram que há benefícios inerentes ao período de estabilização. Em contrapartida, o vigor e a morfologia das células não foram afetados pelo tempo de estabilização em BTS, estando os mesmos dentro das variações observadas por (Barros, 2012; Bianchi, 2011; Medrano *et al.*, 2009).

Os resultados de motilidade total encontrados foram inferiores aos de Barros *et al.* (2012), que chegaram a 49,5% de células móveis por avaliação subjetiva, porém deve-se salientar a simplicidade dos equipamento utilizados, tendo em vista que a centrifugação e envase foi realizada sem utilização de câmara fria e/ou centrífuga refrigerada. No entanto, Silva *et al.* (2013), congelando sêmen de *Pecari Tajacu* (tipo de suíno selvagem) e utilizando estabilização em BTS por três horas alcançaram 36,6% de motilidade total por avaliação subjetiva e 26,7% de acrossomas íntegros através de teste hiposmótico, estando próximos aos resultados encontrados em nosso estudo.

Em trabalhos realizados com suíno miniatura Bama, o tempo de equilíbrio lento à temperatura de bancada por aproximadamente três horas foi considerado ideal (Kong *et al.*, 2012). Essa observação é confirmada em outros estudos, mostrando que cada espécie possui velocidade de refrigeração, equilíbrio e congelação distintas, resultando em variações nos resultados pós congelação (P. Mazur, 1972).

6.2 Experimento 2: Avaliação do efeito da concentração de glicerol e do tempo de interação com sêmen sobre os resultados pós congelação

Entre as particularidades encontradas nos protocolos de congelação de sêmen suíno, não só a concentração do glicerol, mas o momento em que é adicionado e o tempo de contato com sêmen antes da curva de congelação, influenciam os resultados pós congelação (Medrano *et al.*, 2009). Woelders *et al.* (2005), afirmaram que as membranas celulares do espermatozoide de suínos se tornam cada vez mais estáveis quando se encontram em temperaturas abaixo de zero, porém os resultados para a criopreservação se apresentam insatisfatórios devido à curva de refrigeração aplicada para que chegue a 5°C, intervalo considerado crítico na espécie (Kong *et al.*, 2012).

A criopreservação do sêmen de suínos localmente adaptados apresentaram melhores resultados quando realizada com diluente contendo 3% de glicerol com estabilização de quinze minutos prévios à congelação (Tabela 2). Este resultado possivelmente está relacionado à configuração lipídica da membrana, reduzindo a formação de cristais de gelo no interior da célula (Medrano *et al.*, 2009). Yi *et al.*, (2002), ao testar protocolos com diferentes concentrações de glicerol, obtiveram melhor resultado com 2% em volume final. Porém é importante salientar a associação de *Ovus Es Paste* (OEP), citado como detergente, reduzindo o tamanho das moléculas lipídicas, e conseqüentemente maior proteção de membrana celular, o que não foi utilizado em nosso experimento.

Até o presente momento, a composição da membrana celular espermática de raças localmente adaptadas permanece desconhecida, porém os resultados obtidos mostraram que a técnica pode ser aprimorada com objetivo de criopreservação. Existe a hipótese de que exista variação individual relacionada com a capacidade de congelabilidade do sêmen, como relatado recentemente para suínos comerciais, em que a susceptibilidade entre machos

necessitou de adaptação da velocidade de congelação para que fosse obtido material de melhor qualidade (Medrano *et al.*, 2009).

Silva *et al.*, 2013 observaram que catetos selvagens (*Pecari tajacu*) adultos, apresentaram resistência a temperaturas de congelação variando de -10 a -40°C/min na etapa da curva de congelação entre 5°C e -196°C independente da utilização de palhetas de 0,50 ou 0,25 mL. Em suínos comerciais, a velocidade de congelação após o platô de 5°C foi estabelecida como ótima quando atinge -10°C/min com palhetas de 0,5 mL e -50°C/min com palhetas de 0,25 mL (Woelders *et al.*, 2005).

Considerando que a criação de suínos localmente adaptados possui maior frequência em propriedades rurais de base familiar, os resultados alcançados neste Experimento podem contribuir para atividades de enriquecimento de bancos de germoplasma desses animais, uma vez que os protocolos utilizados não necessitam de infraestrutura especializada e de equipamentos robustos e de alto valor, possibilitando sua execução a campo.

7 CONCLUSÃO

A utilização de protocolo com estabilização do sêmen em BTS por duas horas previamente ao início da curva de refrigeração, associado a diluente contendo 3% de glicerol adicionado 15 minutos antes da criopreservação apresentou bons resultados para o congelamento de sêmen de suínos localmente adaptados e pode ser utilizado como alternativa para a conservação em programas de enriquecimento de bancos de germoplasma.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUALPEC. Anuario da pecuária brasileira. **Comunicação FNP Argos**, p. 368, 2012.
- BARROS, M. H. D. C. S. H. H. A. L. D. S. G., S. E. F.; LOPES, P. S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES J. D.;. Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau submetido a três protocolos de congelamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 1806-9290, p. 914-922, 2012.
- BIANCHI, I. M., E. M.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, E. K.; LUCIA JUNIOR, T. ; CORRÊA, M. N. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 7, 2011.
- BLANCH, E. TOMÁS C, GRAHAM JK, MOCÉ E. Response of boar sperm to the treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins added prior to cryopreservation. **Reprod Domest Anim**, v. 47, n. 6, p. 959-64, Dec 2012.
- ERIKSSON BM, VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA, ROCA J, LUCAS X, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1593-605, May 1 2001.
- GOMEZ-FERNANDEZ, J; GÓMEZ-IZQUIERDO E; TOMÁS C; MOCÉ E; DE MERCADO E. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, v. 133, n. 1-2, p. 109-16, Jul 2012.

- HARRISON, R. A.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 88, n. 1, p. 343-52, Jan 1990.
- HUANG J. S, WU CS, JIH CG, CHEN CT.. Effect of addition of Rhodobacter sp. to activated-sludge reactors treating piggery wastewater. **Water Res**, v. 35, n. 16, p. 3867-75, Nov 2001.
- KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reprod Domest Anim**, v. 42, n. 1, p. 63-7, Feb 2007.
- KONG, D; SHANG H; GUO K; LIU Y; ZHANG J; WEI H. A study on optimizing the cryopreservation methods for Bama miniature pig semen. **Exp Anim**, v. 61, n. 5, p. 533-42, 2012.
- MEDRANO, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 41, n. 4, p. 246-50, Aug 2009.
- P. MAZUR, S. P. L., E.H. CHU. A two-factor hypothesis of freezing injury evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Exp Cell Res**, v. 71, p. 345-355, 1972.
- PARRILLA, I.; DEL OLMO D, SIJSES L, MARTINEZ-ALBORCIA MJ, CUELLO C, VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA, ROCA J. Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. **Anim Reprod Sci**, v. 132, n. 1-2, p. 66-73, May 2012.
- SELLES E, GADEA J, ROMAR R, MATÁS C, RUIZ S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. **Reprod Domest Anim**, v. 38, n. 1, p. 66-72, Feb 2003.
- SILVA MA, PEIXOTO GC, CASTELO TS, LIMA GL, SILVA AM, OLIVEIRA MF, SILVA AR. Cryopreservation of collared peccary (Pecari tajacu) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 50-5, Aug 2013.
- WALTER, B.M.; SAMPAIO, A.B., A vegetação da fazenda sucupira. 1998. 110p. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 1998.

WOELDERS H, MATTHIJS A, ZUIDBERG CA, CHAVEIRO AE. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 383-95, Jan 15 2005.

YI, Y.J.; IM, G.S; PARK, C.S. Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 74, p. 187-194, Dec. 2002