

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



TESE

Congelamento de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extracelulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade

IVAN BIANCHI

Pelotas, 2007

IVAN BIANCHI

**Congelamento de sêmen suíno: estudo de
crioprotetores intra e extracelulares, metodologias de
congelamento e marcador molecular de
congelabilidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia Agrícola).

Orientador:

Marcio Nunes Corrêa, Dr.
Prof° Adjunto, UFPEL

Co-Orientadores:

João Carlos Deschamps, PhD
Prof° Titular, UFPEL

Thomaz Lucia Jr., PhD
Prof° Adjunto, UFPEL

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B577c Bianchi, Ivan

Congelamento de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extracelulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade / Ivan Bianchi ; orientador Marcio Nunes Corrêa ; co-orientador João Carlos Deschamps, Thomaz Lucia Jr. – Pelotas, 2007. – 94f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Amidas. 3.Suínos. 4.Sêmen congelado. 5.Criopreservação. 6.Glicerol. I.Corrêa, Marcio Nunes II.Deschamps, João Carlos. III.Lucia Jr., Thomaz. IV.Titulo.

CDD: 636.408245

BANCA EXAMINADORA

Eraldo Lourenso Zanella, PhD

Prof° Adjunto, UPF

Fernando Pandolfo Bortolozzo, PhD

Prof° Associado, UFRGS

João Carlos Deschamps, PhD

Prof° Titular, UFPEL

Thomaz Lucia Jr., PhD

Prof° Adjunto, UFPEL

Marcio Nunes Corrêa, Dr.

Prof° Adjunto, UFPEL (*Orientador*)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Ao meu pai...

Vilson Caetano Bianchi (In memorian), pelo seu exemplo de bondade, humildade, honestidade, generosidade e trabalho durante toda sua vida.

Pai, Sempre sentirei sua presença junto de mim...

A minha família...

Minha mãe Helena Bianchi e minha irmã Sílvia Bianchi pelo apoio que sempre me deram.

Vocês são muito importantes na minha vida, que Deus sempre as ilumine...

A minha esposa...

Louise Trindade de Oliveira por todo seu carinho, incentivo, amor e sonhos que temos para nossa vida juntos. Te admiro muito...

Lu, Sinceramente, Te Amo...

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola (PPGBA) pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador Prof^o Marcio Nunes Corrêa pela confiança depositada em mim, seu exemplo de empenho, sinceridade, seu entusiasmo contagiante e amizade durante todo o tempo.

Ao co-orientador Prof^o João Carlos Deschamps pela valiosa orientação, opiniões e sugestões no trabalho, seu exemplo de simplicidade além de nossas conversas que muito contribuíram para o meu amadurecimento e formação.

Ao co-orientador Prof^o Thomaz Lucia Jr. pela grande amizade, ensinamentos transmitidos e momentos de descontração nos tempos vagos em todos esses anos de convivência.

Aos membros da banca de Qualificação (Prof^{os} Eraldo Lourenso Zanella, João Carlos Deschamps, Thomaz Lucia Jr. e Marcio Nunes Corrêa) e aos membros desta banca de Defesa de Tese (integrantes da banca de qualificação além do Prof^o Fernando Pandolfo Bortolozzo) pela disponibilidade e colaborações para o trabalho.

A todos que participaram da realização das nove edições do “*Curso Latino Americano Teórico-Prático de Processamento de Sêmen e Inseminação Artificial em Suínos*” através do qual proporcionou os recursos financeiros para a realização do projeto.

A todos que neste período participaram do Grupo PIGPEL, meus sinceros agradecimentos pela colaboração na execução dos trabalhos, especialmente a Kérlim Calderam, Elisângela Mirapalheta Madeira e Éder Francisco Maschio (fiéis

escudeiros), Rafael da Rosa Ulguim, Arlan Perondi, Naiana Oliveira Martins, Ca Dahl Corcini, Fernando Rocha e José Luís Corezzolla.

Aos colaboradores do Centro Agropecuário da PALMA, local de alojamento dos animais utilizados nos experimentos.

Aos colegas e amigos do Grupo de Pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal (EMTA) Tiago Collares, Paulo Varoni Cavalcanti, Vinicius Farias Campos, Gissele Rambo, Priscila Marques Moura de Leon, Elisa Caroline da Silva Santos pela valiosa ajuda nos experimentos.

A Empresa IRGOVEL que forneceu a alimentação dos animais utilizados nos experimentos durante todo o tempo do trabalho.

As Empresas: Grupo Extremo Sul (Granja RETIRO) e Frigorífico CASTRO pela fundamental parceria na realização do experimento *In vivo*.

As Empresas GENSUL Inseminação Artificial e IMV – IVP Brasil que forneceram parte do material de consumo para os experimentos realizados.

Aos Professores da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Botucatu/SP), Dr^a Fernanda da Cruz Landim Alvarenga e Dr. Marco Antonio Alvarenga, além do doutorando Antonio Sylvio Lopes de Medeiros pela importante ajuda na definição dos crioprotetores e avaliações de fluorescência.

Ao Engenheiro Agrônomo Luis Antônio Suita de Castro da EMBRAPA Clima Temperado pela realização dos trabalhos de Microscopia Eletrônica.

Aos laboratórios do Centro de Biotecnologia (CENBIOT) pela disponibilidade da infra-estrutura e materiais utilizados na realização dos trabalhos.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação Érico Kunde Corrêa e Géferson Fischer pelos trabalhos realizados e amizade conquistada.

Aos meus grandes amigos Érico Kunde Corrêa, Marcus Vinicius Figueira de Alvarenga, Eduardo Schmitt, Marcelo Brandi Vieira, Vinicius Coitinho Tabeleão, Lucas de Castilho Cadore, Rangel Guzzo, Rafael de Almeida, Roberta Dalmolin Bergoli e Luciano Baroni, pelo incentivo em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A graça da vida...

EPÍGRAFE

“Somente a Educação poderá transformar um país verdadeiramente...”

Cristovam Buarque

RESUMO

BIANCHI, Ivan. **Congelamento de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extracelulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade**. 2007. 94f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Apesar do sêmen suíno congelado estar disponível comercialmente desde 1975, o seu uso tem ocorrido somente em ocasiões específicas, pois, em relação ao uso de sêmen refrigerado, requer duas a três vezes maior número de espermatozoides por dose, o processamento do sêmen é trabalhoso, o tamanho da leitegada é diminuído em um a três leitões por parto e a taxa de parição é menor. Dessa forma, a grande maioria das inseminações artificiais nessa espécie utiliza sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18 °C. Os objetivos desta tese foram: avaliar diferentes diluidores de resfriamento, metodologias de congelamento, temperaturas de centrifugação, uso de crioprotetores intracelulares a base de amidas e extracelulares baseados em lipoproteína de baixa densidade, além do estudo de fatores protéicos presentes no plasma seminal nos resultados de avaliações *in vitro* e *in vivo* de sêmen suíno congelado-descongelado. Foram executados cinco experimentos com avaliações da qualidade do sêmen congelado-descongelado, quatro experimentos com avaliações *in vitro* (motilidade e integridade de membrana) e um experimento com fertilização *in vivo*. O tratamento utilizado como controle foi o congelamento com glicerol na concentração de 3%. A melhor curva de resfriamento após a coleta até 15 °C, foi atingida com o tempo de 120 min. Foi identificado um fator de 26 kDa no plasma seminal, cuja ausência proporcionou melhores resultados de integridade de membrana plasmática após o descongelamento. O uso do crioprotetor intracelular dimetilacetamida na concentração de 5%, proporcionou nas avaliações *in vitro*, resultados superiores ao tratamento controle (glicerol 3%), não diferindo na avaliação *in vivo*. O presente estudo demonstrou a relação de componentes do plasma seminal com a qualidade espermática, além de apresentar um novo protocolo de congelamento-descongelamento de sêmen suíno baseado no uso de dimetilacetamida 5%.

Palavras-chave: Amidas. Sêmen congelado. Suíno. Criopreservação. Glicerol.

ABSTRACT

BIANCHI, Ivan. **Freezing of boar semen: study of penetrating and nonpenetrating cryoprotectants, freezing methods and freezability molecular marker.** 2007. 94f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Although boar semen is available in the frozen format since 1975, its use has been restricted to very specific situations for many reasons: it requires spermatozoa concentration per dose twice to three times higher than that for cooled semen; semen processing is labor intensive; and farrowing rate and litter size are reduced. Thus, most of the artificial inseminations in swine are performed at the day of semen collection or at most at the following day, using liquid semen conditioned between 15 and 18 °C. The aims of this thesis were: to evaluate distinct extenders for cooling semen, methods for freezing, centrifugation temperatures, the use of amides as penetrating cryoprotectants and of low density lipoprotein as nonpenetrating cryoprotectants, and the presence of specific protein factors in seminal plasma in the results that could be associated with boar semen freezability. Five experiments have been executed: four with evaluations *in vitro* (motility and cell membrane integrity); and one with fertilization *in vivo*. The control treatment was the freezing with glycerol at 3% concentration. The semen processing method that provide more efficient results consisted of semen cooling during 120 min up to a centrifugation temperature of 15 °C. We also identified a 26 kDa factor in the seminal plasma that is associated with maintenance of the integrity of the sperm cell membrane post-thawing. Additionally, parameters of semen quality *in vitro* with the use of dimetilacetamide at 5% were better than those observed with the most used penetrating cryoprotectant (glycerol 3%) as control, although no difference between those cryoprotectants was observed *in vivo*. This study demonstrated the association of components in the seminal plasma with the sperm quality, and presenting an alternative protocol of semen freezing-thawed boar semen based in the use of dimetilacetamide at 5%.

Keywords: Amides. Frozen semen. Swine. Cryopreservation. Glycerol.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| Banca Examinadora _____ | 4 |
| Dedicatória _____ | 5 |
| Agradecimentos _____ | 6 |
| Epígrafe _____ | 8 |
| Resumo _____ | 9 |
| Abstract _____ | 10 |
| Sumário _____ | 11 |
| 1. Introdução Geral _____ | 12 |
| 2. Objetivos _____ | 16 |
| 3. Artigo I: Efeito de diferentes diluidores e períodos de resfriamento sobre a motilidade de sêmen suíno criopreservado _____ | 17 |
| 4. Artigo II: Evaluation of cryoprotectant properties of different amides in the boar semen freezing _____ | 31 |
| 5. Artigo III: Efeito do uso de gema de ovo e lipoproteína de baixa densidade na criopreservação de sêmen suíno _____ | 47 |
| 6. Artigo IV: Inseminação artificial pós-cervical de leitoas com sêmen suíno criopreservado utilizando dimetilacetamida e glicerol _____ | 58 |
| 7. Artigo V: Identificação de um fator de 26 kda no plasma seminal associado a integridade de membrana de espermatozóides suínos pós-descongelamento _____ | 73 |
| 8. Conclusões Gerais _____ | 87 |
| 9. Considerações Finais _____ | 88 |
| 10. Referências _____ | 91 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

A grande maioria das inseminações artificiais (IA) em suínos realizadas no mundo utiliza sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18 °C, por um período de 1 a 5 d, sendo que 85% destas são realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte (JOHNSON *et al.*, 2000). Entretanto, a temperatura de estocagem de 15 a 18 °C limita o transporte do sêmen, pois exige caixas térmicas específicas para esta faixa de temperatura, além de restringir o tempo de vida útil do sêmen. Alguns diluentes têm sido desenvolvidos a fim de possibilitar o prolongamento no tempo de estocagem do sêmen de 3 para 5-7 d (LEVIS, 2000), ou o seu armazenamento a 5 °C (CORRÊA *et al.*, 2004). Ainda que a utilização da IA em suínos esteja aumentando, sua expansão poderia ser incrementada se técnicas como a criopreservação (congelamento) do sêmen possibilitasse adequados resultados de fertilidade, tal como ocorre na espécie bovina (DESCHAMPS *et al.*, 1997; WATSON, 2000). Afora esta questão, a IA e o sêmen congelado apresentam vantagens de relevada importância para os sistemas de produção, pois favorecem o uso em escala de animais geneticamente superiores (BORTOLOZZO *et al.*, 2005; GERRITS *et al.*, 2005). No entanto, apesar do sêmen suíno congelado estar disponível comercialmente desde 1975, o seu uso tem ocorrido somente em ocasiões específicas, como em casos de importação de genética, visando à produção de reprodutores (JOHNSON e LARSSON, 1985). A IA com sêmen suíno congelado requer duas a três vezes mais espermatozoides por dose, o processamento do sêmen é trabalhoso, o tamanho da leitegada é diminuído em um a três leitões por parto e a taxa de parição é menor. Esses fatores inviabilizam economicamente seu uso em sistemas de produção, quando comparada a IA com sêmen acondicionado refrigerado na forma líquida (JOHNSON, 1985; ERIKSSON *et al.*, 2001; ROCA *et al.*, 2003; SARAVIA *et al.*, 2005).

A diminuição da fertilidade do sêmen suíno congelado é resultado de danos na capacidade funcional dos espermatozóides devido ao choque térmico (ALTHOUSE *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2000; WATSON, 2000). Outro aspecto relevante, diz respeito ao estresse osmótico provocado pela adição das soluções crioprotetoras que provocam a desidratação celular ocasionando altas concentrações intracelulares de sais (BALL e VO, 2001). As alterações decorrentes do choque térmico e estresse osmótico irão provocar alterações estruturais e funcionais da célula espermática (PURSEL *et al.*, 1972; PURSEL e JOHNSON, 1975; BUHR, 1991; BUHR *et al.*, 1994). Tais alterações implicam em um efeito negativo sobre a motilidade espermática e sobre trocas metabólicas através das membranas celulares, que podem influenciar negativamente os processos de capacitação espermática e o mecanismo de fertilização (WATSON, 1996; NARDID *et al.*, 1997), ou até mesmo levar à morte celular (DE LEEUW *et al.*, 1991; WATSON, 1996).

A composição da membrana plasmática do espermatozóide suíno difere da membrana plasmática de outros mamíferos, tais como o touro, que são mais resistentes ao congelamento. Essa diferença está relacionada ao tipo de fosfolípido predominante e à relação colesterol/fosfolípido (PARKS e LYNCH, 1992). As espécies de animais cujos espermatozóides possuem maior resistência ao congelamento, contêm uma alta relação colesterol/fosfolípido na membrana (BUHR *et al.*, 1994; BUHR *et al.*, 2000).

Para o congelamento de sêmen são utilizados crioprotetores intracelulares e extracelulares, cuja finalidade é proteger a célula espermática das lesões provocadas pelo congelamento e descongelamento celular (KAROW, 2005). O princípio da técnica de congelamento celular consiste na diminuição do metabolismo e na desidratação da célula através do uso de crioprotetores intracelulares (baixo peso molecular) e extracelulares (alto peso molecular). Essas soluções crioprotetoras normalmente têm um caráter de hiperosmolaridade que reduzem o ponto de congelamento para -5 a -7 °C, interagem e estabilizam as membranas celulares e atuam como tampão salino no combate aos efeitos deletérios das altas concentrações de eletrólitos nas células desidratadas (DE LEEUW *et al.*, 1993; NICOLA, 1997).

Os protocolos de congelamento para sêmen suíno convencionalmente utilizados, baseiam-se no método descrito por Westendorf *et al.* (1975), em que o

plasma seminal é retirado somente quando a curva de resfriamento atingir 15 °C, e no protocolo de Paquignon *et al.* (1974), pelo qual imediatamente após a coleta do ejaculado é feita a remoção do plasma seminal através de centrifugação. Ambos os métodos utilizam o glicerol como crioprotetor intracelular e a gema de ovo como crioprotetor extracelular. No entanto, o glicerol em determinadas concentrações, tem um potencial efeito citotóxico na célula espermática em detrimento das suas características benéficas como crioprotetor (ALMLID e JOHNSON, 1988; HOLT, 2000; WATSON, 2000). Além disso, os radicais hidroxila do glicerol podem ligar-se entre si, diminuindo a probabilidade de ligações com as moléculas de água, sendo assim, uma característica desfavorável ao processo de criopreservação (WOWK *et al.*, 1999). Dessa forma, a ineficiência do congelamento do sêmen suíno é também atribuída aos crioprotetores e diluentes utilizados, sugerindo que outras soluções crioprotetoras e metodologias de congelamento sejam testadas (KUSTER e ALTHOUSE, 1999; BUHR *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002b).

Estudos com a utilização de crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos com obtenção de bons resultados em equinos, através do uso de diferentes amidas (MEDEIROS *et al.*, 2002a; VIDAMENT *et al.*, 2002). A dimetilacetamida é um crioprotetor largamente utilizado nos protocolos de criopreservação de espermatozóides de peixes (CABRITA *et al.*, 1998; OGIER DE BAULNY *et al.*, 1999) e de aves (TSELUTIN *et al.*, 1999), trazendo benefícios a estas espécies na resposta pós-descongelamento.

As amidas possuem um mecanismo de ação crioprotetor diferente do glicerol, devido sua estrutura molecular e sua habilidade de permear a membrana celular. O mecanismo de ação das amidas é devido seu grupamento funcional amina, o qual contém nitrogênio, portanto, quimicamente distinto do grupamento funcional do glicerol que são as hidroxilas. As amidas realizam ligações de hidrogênio com a molécula da água em três sítios de ligação. Além disso, devido ao menor peso molecular e viscosidade das amidas em relação ao glicerol, elas possuem maior permeabilidade de membrana, diminuindo a possibilidade de danos celulares causados por estresse osmóticos (BALL e VO, 2001). Desta forma supõem-se que as amidas possuam uma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula da água, desempenhando um mecanismo crioprotetor celular mais eficiente que o glicerol (BALL e VO, 2001; KAROW, 2001). Entretanto, estes crioprotetores intracelulares não têm sido testados para sêmen suíno.

Como crioprotetor externo, a gema de ovo é usualmente adicionada aos diluidores dos protocolos de congelamento de sêmen suíno (PAQUIGNON *et al.*, 1974; WESTENDORF *et al.*, 1975). Entretanto, a gema de ovo contém substâncias que podem dificultar o metabolismo, diminuindo a motilidade espermática (PACE e GRAHAM, 1974), além de ter risco de contaminação por microorganismos, por se tratar de um composto de origem orgânica (BOSSEAU *et al.*, 1998). O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais atuam na superfície da membrana plasmática restaurando a perda de fosfolípidios e colesterol (BERGERON *et al.*, 2004). A substituição da gema de ovo por LDL foi benéfica para a manutenção da qualidade espermática em sêmen de cães, quando preservado a temperatura de refrigeração a 5°C ou congelado (VARELA JÚNIOR, 2005). Enquanto que LDL na concentração de 8% pode substituir a gema de ovo na composição do diluente utilizado para criopreservar sêmen eqüino (MARTIN, 2005). A ação crioprotetora da LDL purificada da gema de ovo (MOUSSA *et al.*, 2002) na preservação de espermatozoides suínos foi estudada por DEMANIOWICZ e STRZEZEK (1996) com o uso de sêmen refrigerado, portanto, em estado líquido. Entretanto, este crioprotetor extracelular pouco tem sido testado para o congelamento de sêmen suíno.

Outro fator importante relacionado ao uso de sêmen congelado é a grande variabilidade observada entre machos, cujos fatores que influenciam as diferenças observadas na sobrevivência espermática e aos processos de congelamento e descongelamento, ainda não estão bem elucidados (ROCA *et al.*, 2006).

Alguns autores (JOBIM *et al.*, 2004) sugerem que há diferenças nas proteínas do plasma seminal de touros com boa e má resposta ao congelamento, sugerindo o estudo dessas proteínas do plasma como marcadores de congelabilidade. A influência do plasma seminal na qualidade espermática é contraditória, tendo sido observado que a sua presença provocou maior sensibilidade ao choque térmico (PURSEL *et al.*, 1972). Porém, em outro estudo a remoção do plasma não interferiu na viabilidade pós-descongelamento (SALAMON, 1973). No entanto, as diferenças observadas na congelabilidade entre machos suínos, podem ser atribuídas à influência genética, podendo ser identificadas através de marcadores de moleculares do ejaculado (THURSTON *et al.*, 2001; THURSTON *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desta tese foram:

1. Verificar o efeito de diferentes diluidores e períodos de estabilização durante o resfriamento do sêmen, sobre a motilidade pré-congelamento e após o descongelamento;
2. Estudar a criopreservação de sêmen suíno através do uso de crioprotetores intracelulares a base de amidas, em diferentes concentrações, relacionados com a motilidade e integridade da membrana plasmática no sêmen descongelado;
3. Avaliar o uso de diferentes temperaturas de centrifugação do sêmen sobre os parâmetros de motilidade e integridade da membrana plasmática após o descongelamento;
4. Identificar marcadores moleculares no plasma seminal, relacionados com a integridade de membrana plasmática do sêmen descongelado;
5. Analisar o uso de gema de ovo e lipoproteína de baixa densidade (LDL) na composição dos diluidores utilizados no resfriamento e congelamento do sêmen, sobre a motilidade e integridade da membrana plasmática após o descongelamento;
6. Comparar a fertilidade *in vivo* de sêmen suíno congelado à base de amida em relação ao uso de glicerol.

3. ARTIGO I: Efeito de diferentes diluidores e períodos de resfriamento sobre a motilidade de sêmen suíno criopreservado

**Submetido: *Revista Brasileira de Reprodução Animal*
(Formatado segundo as normas da revista)**

**Ivan *Bianchi*; Marcio Nunes *Corrêa*; Thomaz *Lucia Jr.*, Érico Kunde *Corrêa*;
Kérlin *Calderam*; João Carlos *Deschamps***

Resumo

O objetivo deste trabalho foi comparar o uso de diferentes diluidores e períodos de estabilização utilizados no pré-congelamento, sobre a motilidade do sêmen suíno após o congelamento. Foram utilizados durante o resfriamento do sêmen até 15 °C, dois diluentes com crioprotetor extracelular na composição: PIGPEL-5 (gema de ovo) e PIGPEL+ (lipoproteína de baixa densidade) e um diluente sem crioprotetor (BTS). Também foram utilizados dois períodos de estabilização até 15 °C: padrão (270 min) e curto (120 min). A motilidade a 5 °C e pós-descongelamento (10 e 30 min) foi maior ($P < 0,05$) para o BTS, em relação a PIGPEL-5 e PIGPEL+. A motilidade no resfriamento curto foi superior ($P < 0,05$) ao padrão a 5 °C e pós-descongelamento. O uso de diluente sem crioprotetor extracelular foi mais eficiente no período de resfriamento até 15 °C, enquanto que a redução do período de estabilização foi associado a melhora da qualidade do sêmen descongelado.

Palavras-chave: Lipoproteína de baixa densidade, gema de ovo, criopreservação, sêmen suíno.

Abstract

The aim of this study was to compare the use of different extenders and stabilization periods before freezing on the motility of boar semen after thawing. Two extenders were used during cooling up to 15 °C including different nonpenetrating crioprotectants: PIGPEL-5 (egg yolk) and PIGPEL+ (low density lipoprotein) and one extender without crioprotectant (BTS). Also, two stabilization periods were tested: control (270 min) and short (120 min). The motility at 5°C and post-thawing (10 and 30 min) was better ($P < 0.05$) for BTS than for both PIGPEL-5 and PIGPEL+. The motility was better ($P < 0.05$) after short cooling than for the control both at 5 °C and post-thawing. The use of extender without nonpenetrating crioprotectant was more efficient during the stabilization period and the short cooling was associated with better motility post-thawing.

Keywords: Low density lipoprotein, egg yolk, cryopreservation, boar semen.

Introdução

O sêmen suíno refrigerado entre 15-18 °C é utilizado na maioria das inseminações artificiais (IA). Os índices de fertilidade com IA são similares aos obtidos com monta natural, quando o sêmen refrigerado é utilizado até 72 h após o início do armazenamento, mas aproximadamente 85% das IA são realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte (Johnson *et al.*, 2000). O diluente mais utilizado para sêmen suíno refrigerado é o *Beltville Thawing Solution* (BTS), desenvolvido por Pursel & Johnson (1975) inicialmente para sêmen congelado, sendo, posteriormente, adaptado para o acondicionamento de sêmen à 15-18 °C. Alguns diluentes foram desenvolvidos para permitir maior tempo de armazenagem de 5-7 d (Levis, 2000), ou a 5 °C (Corrêa *et al.*, 2004).

A IA e o congelamento do sêmen são biotécnicas reprodutivas importantes para aumentar a eficiência de produção dos rebanhos, especialmente devido ao uso em maior escala de animais geneticamente superiores (Bortolozzo *et al.*, 2005; Gerrits *et al.*, 2005). Porém, durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento os espermatozóides são expostos a várias situações adversas a sua homeostase, tornando-se susceptíveis aos choques térmico e osmótico, que podem promover alterações estruturais e funcionais na célula espermática, com prejuízos para a motilidade e nas trocas que ocorrem através da membrana plasmática (Buhr, 1991; Buhr *et al.*, 1994). Em função destas injúrias celulares, pode ocorrer o comprometimento dos processos de capacitação e fertilização (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 1989; Hofmo & Almlid, 1991; Watson, 1996; Nardid *et al.*, 1997), ou mesmo a morte celular (De Leeuw *et al.*, 1991; Watson, 1996).

Apesar do uso de sêmen suíno congelado ter sido disponibilizado desde 1975, nas IA de rotina em granjas ele não é difundido, em função da obtenção de taxas de parição de 50-70% e de um total de 7-10 leitões nascidos por leitegada, o que é consideravelmente inferior aos índices obtidos com sêmen refrigerado. Além disso, doses inseminantes de sêmen congelado exigem número de espermatozóides duas a três vezes maiores do que com sêmen refrigerado, para compensar os possíveis danos celulares associados ao congelamento (Johnson, 1985; Wagner & Thibier, 2000; Eriksson *et al.*, 2001).

A maioria dos protocolos de congelamento utilizados atualmente é baseada no método descrito por Westendorf *et al.* (1975) (WE), no qual o plasma seminal é retirado quando a curva de resfriamento atingir 15 °C. O sêmen suíno, antes do

congelamento, precisa passar por um período de estabilização (tempo de resfriamento), para que os componentes do diluente possam interagir com as estruturas moleculares da membrana da célula espermática, e também para que estas estruturas se adaptem à exposição a baixas temperaturas, com a finalidade de aumentar a resistência espermática ao choque térmico (Garcia Casado *et al.*, 2001). No protocolo WE, a gema de ovo é adicionada aos diluidores, a fim de proteger a membrana da célula espermática das injúrias provocadas por baixas temperaturas, especialmente abaixo de 15 °C. O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Watson, 1981; Bergeron *et al.*, 2004). A ação crioprotetora da LDL purificada da gema de ovo sobre a preservação de sêmen suíno foi comprovada por Demaniowicz & Strzezek (1996). O diluente PIGPEL-5 (Corrêa *et al.*, 2004), desenvolvido para o acondicionamento de sêmen suíno a 5 °C, possui 2% de gema de ovo na sua composição.

Os resultados insatisfatórios obtidos com sêmen suíno congelado, em geral, são atribuídos à ineficiência dos diluentes e crioprotetores, o que sugere que novas soluções crioprotetoras e métodos diferentes de congelamento devam ser testados (Kuster & Althouse, 1999; Buhr *et al.*, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes crioprotetores bem como de métodos de congelamento sobre a motilidade do sêmen suíno.

Material e Método

Coleta de amostras

Foram utilizados dois machos suínos cruzados (Landrace x Large White) com aproximadamente 18 meses de idade, os quais apresentavam fertilidade conhecida e eram mantidos em baias individuais, sob as mesmas condições ambientais, na Estação Experimental da Palma, Universidade Federal de Pelotas.

Foram coletados dez ejaculados de cada macho. As coletas foram realizadas através do método da mão-enluvada (Bearden & Fuquay, 1997a), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rica em gel. Somente a porção do ejaculado com a maior concentração espermática foi utilizada para ser criopreservada. As porções menos concentradas foram descartadas. Após a coleta do ejaculado, a concentração de células espermáticas foi realizada através do hematocitômetro. Também foi avaliada a motilidade espermática (0 a 100%), por microscopia ótica de

contraste de fases em aumento de 200x (Bearden & Fuquay, 1997b). Somente ejaculados com motilidade > 70% foram utilizados.

Processamento e criopreservação do sêmen

Imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota de 10 ml da fração rica em espermatozóides foi diluída (1:1, v/v), em tubo cônico de 50 ml, em cada um de três diluentes: BTS (Levis, 2000), PIGPEL-5 (Corrêa *et al.*, 2004) e PIGPEL-5, com substituição dos 2% de gema de ovo por quantidade equivalente de LDL (PIGPEL+). A LDL foi obtida através de protocolo descrito por Moussa *et al.* (2002). Para cada um dos três diluentes, foram feitas duas amostras, considerando dois tempos de resfriamento. No tempo de resfriamento denominado Padrão, após a diluição inicial em cada um dos três diluidores de resfriamento, os frascos permaneciam 90 min a 24 °C e, após, 180 min a 15 °C. No tempo de resfriamento denominado Curto, após a diluição inicial, os frascos permaneciam 60 min a 24 °C e, após, 60 min a 15 °C.

Após atingirem 15 °C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 min), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de espermatozóides obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento WE (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo; pH de 6,1) para uma concentração de 450×10^6 espermatozóides/ml. Após, 2 ml da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 ml, realizando-se o resfriamento por 90 min à 5 °C, nos dois métodos de resfriamento (Padrão e Curto). Aos 5 °C, os tubos cônicos com 2 ml de espermatozóides diluídos foram re-suspenso em 1 ml do diluidor de congelamento WE (89,5% de diluidor de resfriamento WE + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste¹ e 9% glicerol, v/v; pH de 6,8) para uma concentração final de 300×10^6 espermatozóides/ml e 3% de glicerol. Após a adição do diluidor de congelamento, em cada um dos seis tratamentos de cada macho (três diluentes e dois tempos de resfriamento), o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, com concentração de 150×10^6 espermatozóides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C até o descongelamento.

Descongelamento das palhetas

Para o descongelamento das palhetas foi utilizado o protocolo de 37 °C por 20 s, em banho-maria com circulação de água.

¹ Minitüb, Germany

Avaliações de qualidade de sêmen

Após a adição do diluidor de congelamento a 5 °C, uma amostra de sêmen foi incubado em tubos cônicos de 15 ml a 37 °C, para a avaliação da motilidade espermática pré-congelamento, através de microscopia ótica com contraste de fases a 200 x (Bearden & Fuquay, 1997b).

Conforme o tempo de descongelamento, as palhetas foram re-suspensas (1:10, v/v) em tubos cônicos de 15 ml (Peña *et al.*, 2003), nos respectivos diluentes utilizados no período de resfriamento até 15 °C (BTS, PIGPEL-5 e PIGPEL+) e incubados a 37 °C. A avaliação da motilidade espermática foi realizada aos 10 e 30 min após o descongelamento. Todas as avaliações foram feitas pelo mesmo técnico.

Análise estatística

Para cada macho no método WE, seguiu-se um delineamento fatorial 3 x 2, representando as combinações de diluentes e tempo de resfriamento, respectivamente. A fim de isolar o efeito dos tratamentos (diluyente e tempo de resfriamento), sobre a motilidade no pré-congelamento e após o descongelamento (10 e 30 min) foi feita análise de variância com medidas repetidas, incluindo a estimativa do efeito de cada coleta e o efeito de cada macho dentro de cada tratamento. Comparação de médias foi feita através do método LSD (*least significant difference*), usando o procedimento GLM (*general linear models*) (SAS®, 1999).

Resultados e Discussão

Efeito do diluyente

Antes do congelamento, observou-se que o sêmen diluído sem a presença de crioprotetor extracelular durante a curva de resfriamento até 15 °C (BTS), apresentou motilidade superior ($P < 0,05$) aos tratamentos que continham crioprotetor, tanto PIGPEL-5 como o PIGPEL+ (Tab. 1). A substituição da gema de ovo por LDL não influenciou a motilidade pré-congelamento ($P > 0,05$). A motilidade aos 10 e 30 min após o descongelamento foi superior ($P < 0,05$) para o tratamento utilizando o diluyente BTS durante o resfriamento do sêmen até 15 °C (Tab. 1), sendo que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL+, durante a curva de resfriamento até 15 °C nos dois momentos da avaliação após o descongelamento (Tab. 1).

A presença de crioprotetor extracelular (gema de ovo ou LDL) durante o período de resfriamento acima de 15 °C influenciou negativamente a motilidade do

sêmen submetido à criopreservação. Bergeron *et al.* (2004) e Manjunath *et al.* (2002) comprovaram que a LDL presente na gema do ovo promove a entrada de fosfolipídio e colesterol na membrana, além de formar um complexo com as proteínas do plasma seminal, prevenindo a saída de fosfolipídio e colesterol da membrana espermática. Os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL+, que possuem crioprotetor extracelular em sua composição, possivelmente não influenciaram a viabilidade espermática a 5 °C e no pós-congelamento, talvez pelo baixo conteúdo de gema de ovo e LDL utilizados na composição do diluente (2%), o que não possibilitou intensificar os mecanismos de proteção propostos por Bergeron *et al.* (2004) e Manjunath *et al.* (2002). Portanto, uma maior inclusão de gema de ovo e LDL pode ser necessária, para aumentar a eficiência destes diluentes.

Efeito do tempo de resfriamento

No pré-congelamento, a motilidade não diferiu ($P > 0,05$) entre o tempo de resfriamento padrão (64,2%) e o curto (64,3%). Após o descongelamento foi observada diferença na motilidade ($P < 0,05$) entre os tempos de resfriamento padrão e curto aos 10 min (35% e 39%, respectivamente), e aos 30 min (32% e 35%, respectivamente).

A motilidade do sêmen submetido ao tempo de resfriamento curto até 15 °C não diferiu no tempo de resfriamento padrão utilizado convencionalmente, na avaliação pré-congelamento, tendo sido superior no pós-descongelamento (10 e 30 min). Eriksson & Rodriguez-Martinez (2000) observaram uma melhora de 5% e 4% na integridade de membranas para os períodos de incubação de 10 e 20 h a 17 °C, respectivamente, em relação à incubação a 15 °C por 3 h. De maneira similar, Kutzer *et al.* (2001) observaram que incubação prévia ou diminuição lenta da temperatura foi associada com redução na sensibilidade do sêmen ao resfriamento a 5 °C. Porém, Garcia-Casado *et al.* (2001) não observaram efeito na motilidade pós-congelamento em função de incubação pré-congelamento por 2,5, 3,5 ou 26 h. Também não foram observados efeitos sobre a motilidade de amostras de sêmen incubado a 15 °C por 3 ou 24 h, ou sobre as taxas de prenhez obtidas posteriormente com este sêmen (Guthrie & Welch, 2005). Neste estudo, o tempo de 120 min para o resfriamento até 15 °C foi suficiente para que as células espermáticas se estabilizassem no diluente em relação ao volume utilizado, adquirindo resistência ao choque térmico, o que proporciona uma sensível redução no tempo necessário para a execução do processo de congelamento. Além disso,

em função do menor tempo de permanência do sêmen em temperatura acima de 15 °C, a produção de catabólitos será menor, em função da redução no metabolismo celular, havendo menor risco de proliferação bacteriana (Althouse & Lu, 2005).

Neste estudo, houve redução na motilidade na avaliação realizada pré-congelamento (a 5 °C) e após o uso do diluidor de congelamento. Estes efeitos podem ser atribuídos a danos irreversíveis na célula espermática em função do choque térmico que ocorre durante o processo de congelamento e descongelamento e, também, ao choque osmótico provocado pelas altas concentrações intracelulares de sais, resultantes do processo de desidratação a que a célula é submetida (Woelders *et al.*, 2005). A redução da motilidade especialmente nas avaliações pós-descongelamento, pode estar associado a um efeito citotóxico devido à presença de glicerol no diluidor de congelamento (Almlid & Johnson, 1988; Holt, 2000).

A motilidade foi usada neste trabalho como único parâmetro de avaliação, em função ser um bom indicador de integridade e funcionalidade das membranas celulares (Gadea, 2005), apresentar boa correlação com o número de espermatozoides por ovócito penetrado (Hammitt *et al.*, 1989), taxa de fertilização *in vivo* (Xu *et al.*, 1996; Flowers & Tumer, 1997; Gadea & Matás, 2000; Brito *et al.*, 2003), taxa de parição e tamanho total de leitegada (Selles *et al.*, 2003; Gadea, *et al.*, 1998, 2004). Gallant *et al.* (1993), ao compararem o efeito de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoide de salmão, trabalharam com apenas um método de avaliação, em virtude do elevado número de tratamentos estudados.

Os melhores resultados de motilidade obtidos neste estudo são comparáveis, ou mesmo superiores, aos obtidos em alguns estudos (Eriksson *et al.*, 2001, 2002; Garcia-Casado *et al.*, 2001; Córdova *et al.*, 2002; Roca *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 2005; Guthrie & Welch, 2005), porém, inferiores aos descritos por Maldjian *et al.* (2005).

Conclusão

A motilidade do sêmen após o descongelamento foi superior nos tratamentos em que foi utilizado o diluidor BTS, sem o componente crioprotetor, e no período de resfriamento curto (120 min), durante o resfriamento do sêmen até 15 °C.

Referências

- Almlid T, Johnson LA.** Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, v.66, p.2899-2905, 1988.
- Althouse GC, Lu KG.** Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, v.63, p.573-584, 2005.
- Bearden HJ, Fuquay JW.** Semen collection. *In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W.* *Appl. Anim. Reprod.* 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997a. p.147-157.
- Bearden HJ, Fuquay JW.** Semen evaluation. *In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W.* *Appl. Anim. Reprod.* 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997b. p.159-170.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v.70, p.708-717, 2004.
- Bortolozzo FP, Wentz I, Dallanora D.** Present situation of artificial insemination in swine. *Acta Sci. Vet.*, 33, p.17- 32, 2005.
- Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP.** Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, p.1539-1551, 2003.
- Buhr MM, He L, Kasimanickam V.** Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION*, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.61-69.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS.** Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, v.31, p.224-238, 1994.
- Buhr MM.** Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION*, 2, 1991, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 1991, p.81-93.
- Córdova A, Pérez-Gutiérrez JF, Lleó B, García-Artiga C, Alvarez A, Drobchak V, Martín-Rillo S.** In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology*, v.57, p.2119-2128, 2002.
- Corrêa MN, Lucia TJr, Deschamps JC, Serret CG, Bordignon J, Rambo G.** Rate of penetration in vitro of oocytes swines using spermatozoa conditioned with extender PIGPEL-5 at 5 °C. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.28, p.161-169, 2004.

- De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ.** The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim., Suppl. 1*, p.95-104, 1991.
- Demaniowicz W, Strzezek J.** The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod. Domest. Anim.*, v.31, p.279-280, 1996
- Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H.** Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology*, v.58, p.1065-1079, 2002
- Eriksson B, Petersson H, Rodriguez-Martinez H.** Individual boar fertility after AI with frozen-thawed semen in relation to in vitro sperm motility and viability. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6, 2001, Missouri-Columbia. **Proceedings...** Missouri-Columbia, 2001, p.54.
- Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H.** Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.*, v.63, p.205-220, 2000.
- Flowers WL, Tumer ZA.** Relationships among motility, morphology and fertility estimates for boar semen. *J. Anim. Sci. Suppl.*, v.75, p.223, 1997.
- Gadea J.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, p.431-444, 2005.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA.** The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod. Domest. Anim.*, v.39, p.1-6, 2004.
- Gadea J, Matás C.** Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, v.54, p.1343-1357, 2000.
- Gadea J, Matás C, Lucas X.** Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.*, v.54, p.95-108, 1998.
- Gallant RK, Richardson GF, Mcniven MA.** Comparison of different extenders for the cryopreservation of atlantic salmon spermatozoa. *Theriogenology*, v.40, p.479-486, 1993.
- Garcia Casado P, Marigorta Del Val P, Diaz Yubero C, Sánchez Sánchez R, Cidoncha Sáiz F.** Influence of equilibration time on boar spermatozoa membranes during the freezing process. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6, 2001, Missouri-Columbia. **Proceedings...** Missouri-Columbia, 2001, p.52.

- Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR.** Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*, v.63, p.283-299, 2005.
- Guthrie HD, Welch GR.** Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, v.63, p.396-410, 2005.
- Hammit DG, Martin PA, Callanan T.** Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, v.32, p.385-399, 1989.
- Hinkovska-Galcheva V, Petkova D, Koumanov K.** Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, v.26, p.70-75, 1989.
- Hofmo PO, Almlid T.** Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 2, 1991, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 1991, p.111-122.
- Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF.** The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, p.370-382, 2005.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.3-22, 2000.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.143-172, 2000.
- Johnson LA.** Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1985, p.199-222.
- Katzer LH, Bernardi ML, Padilha AP, Leeznieski LF, Bortolozzo FP, Wentz I.** Sensitivity of boar semen according to incubation time and cooling rate. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6, 2001, Missouri-Columbia. **Proceedings...** Missouri-Columbia, 2001, p.55.
- Kuster CE, Althouse GC.** The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-Cell™ extenders. *Theriogenology*, v.52, p.365-376, 1999.
- Levis DG.** Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.121-128.

- Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolin S, Penny P, Noble R.** Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.411-421, 2005.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M.** Major Proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1250-1258, 2002.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- Nardid O, Dyubko T, Repina S.** A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins. *Cryobiology*, v.34, p.107-113, 1997.
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Martinez-Rodriguez H.** Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, v.60, p.677-689, 2003.
- Pursel VG, Johnson LA.** Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, v.40, p.99-102, 1975.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vasquez JM, Matinez EA.** Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p.77-87, 2003.
- Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S.** Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar sēmen and to predict the subsequent fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, v.38, p.66-72, 2003.
- SAS®. 1999.** SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Xu X, Seth PC, Harbison DS, Cheung AP, Foxcroft GR.** Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology*, v.46, p.1325-1337, 1996.
- Wagner HG, Thibier M.** World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 14, 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.77.
- Watson PF.** Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Germany. **Proceedings...** Germany, 1996, p.135-140.

Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fertil., v.62, p.483-492, 1981.

Westendorf P, Richter L, Treu H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. Dtsch Tierarztl Wschr, v.82, p.261-267, 1975.

Woelders H, Matthijs A, Zuidberg CA, Chaveiro AEN. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. Theriogenology, v.63, p.383-395, 2005.

Tabela 1: Motilidade espermática (\pm erro padrão) nos diferentes momentos de avaliação em função do diluente utilizado durante o resfriamento até 15 °C

| Diluyente | Momento da avaliação | | |
|-----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Pré-congelamento a 5 °C | Descongelamento 10 min | Descongelamento 30 min |
| BTS | 68 \pm 0,8 ^a | 43 \pm 1,7 ^a | 37 \pm 1,5 ^a |
| PIGPEL-5 | 62 \pm 0,8 ^b | 34 \pm 1,7 ^b | 32 \pm 1,5 ^b |
| PIGPEL+ | 63 \pm 0,8 ^b | 33 \pm 1,7 ^b | 31 \pm 1,5 ^b |

^{ab} Médias na coluna com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

4. ARTIGO II: Evaluation of cryoprotectant properties of different amides in the boar semen freezing

Submetido: *Cryobiology*
(Formatado segundo as normas da revista)

**Ivan Bianchi; Kérlin Calderam; Éder Francisco Maschio; Elisângela Mirapalheta
Madeira; Rafael da Rosa Ulguim; Denise Calisto Bongalhardo; Érico Kunde
Corrêa; Thomaz Lucia Jr.; João Carlos Deschamps; Marcio Nunes Corrêa**

Abstract

The main objective of this study was to evaluate the amide use in the freezing boar semen. The study consisted of two experiments. Semen from four boars was frozen using four cryoprotectants: glycerol at the concentration of 3% (Gly) and three amides at 5%: methylformamide (MF); dimethylformamide (DMF); and dimethylacetamide (DMA). Two centrifugation temperatures were evaluated: 15 °C (T15); and 24 °C (T24). In Experiment 1 (EXP1), all the four cryoprotectants and both centrifugation temperatures were compared. In Experiment 2 (EXP2), only the amides were used, at concentrations of 3, 5 and 7%, considering the same two centrifugation temperatures. In both experiments, sperm motility and membrane integrity post-thawing were compared across treatments and temperatures. In EXP1, sperm membrane integrity was higher for MF, DMF and DMA than for Gly ($P < 0.05$). Also, sperm motility for DMF and DMA were superior to that observed with Gly ($P < 0.05$), but no differences were observed between MF and Gly ($P > 0.05$). In EXP2, generally, amide inclusion at 5% provided better results for sperm motility and membrane integrity than inclusion at 3% and 7% ($P < 0.05$). There was no difference in sperm motility between DMA and DMF ($P > 0.05$), but motility was higher for both amides than for MF ($P < 0.05$). Sperm membrane integrity was superior for DMA than for DMF and MF ($P < 0.05$). Both sperm motility and membrane integrity were also superior for T15 than for T24 ($P < 0.05$) in the two experiments. These results indicate that DMA at 5% with T15 can replace glycerol in boar semen cryopreservation protocols.

Key Words: Amides, Glycerol, Cryopreservation, Centrifugation, Boar semen.

Introduction

Most of the artificial inseminations (AI) in swine are performed using semen extended and stored in liquid state at temperatures between 15 and 18 °C, during 1 to 5 d. Nearly 85% of those AI are conducted at the day of semen collection or at the following day [29]. Some extenders have been developed to store semen at the mentioned temperatures from 3 to 5-7 d [36], or even at lower temperatures such as 5 °C [11]. However, despite of the fact that it is commercially available since 1975, frozen swine sperm have been used only in very specific conditions, such as for importing genetics to produce breeding stock [31]. AI with frozen semen not only requires two to three times more sperm per dose, but also leads to reduction in both farrowing rate and litter size, when compared to AI with cooled semen, which impairs its commercial use [14,18,30,52,54].

Glycerol is the most used intracellular cryoprotectant in swine sperm cryopreservation protocols, usually at the concentration of 3% [30,38,52,63]. However, despite its beneficial action as a cryoprotectant, glycerol is potentially cytotoxic in some concentrations [1,25,30,62], also having a contraceptive effect in some species [23,27,49,55].

The inefficiency on the cryopreservation of swine sperm is attributed to both the extenders and cryoprotectants commonly used, which indicates that other cryoprotectant solutions should be tested [7,34,41]. However, studies reporting the use of alternative cryoprotectants to freeze boar sperm are limited. In equine, sperm cryopreservation faces challenges similar to those reported for swine. In that specie, studies reported acceptable results using amides as cryoprotectants rather than glycerol [2,19,40,61], but such intracellular cryoprotectants have not been tested in swine.

The objective of this study was to evaluate the effect of the methylformamide (MF), dimethylformamide (DMF) and dimethylacetamide (DMA) as intracellular cryoprotectants, in different concentrations and centrifugation temperatures, in comparison with glycerol, in boar semen freezing protocols.

Materials and Methods

Two experiments were conducted, both using four crossbred boars (Landrace x Large White) having approximately 24 months of age and known fertility. The boars were housed in individual pens, under the same environmental conditions, at the Palma Experimental Station of the Universidade Federal de Pelotas (Brazil).

Semen collections were performed using the gloved-hand technique [5], using a plastic glass protected by an isothermic vacuum bottle covered with gauze, to separate the gel-rich fraction of the ejaculate. Only the sperm-rich fraction of the ejaculate was used for freezing [46,63]. After collection, sperm motility was evaluated using a phase contrast optical microscopy, under 200x magnification [6]. Only ejaculates having motility equal or higher than 70% were processed.

Experiment 1

Ten ejaculates were collected from each male. Immediately after collection, two 20 ml samples from the sperm-rich fraction were placed into 50 ml conic tubes and diluted (1:1, v/v) in *Beltsville Thawing Solution* (BTS) [50]. After dilution, semen was refrigerated for 60 min at 24 °C.

Two semen centrifugation temperatures were tested: 15 °C (T15) and 24 °C (T24). For T24, semen samples were cooled up to 24 °C and then centrifuged at 800 x *g* during 10 min (SORVALL[®]RC6). The supernatant was discarded and the sperm pellet was resuspended in the cooling extender (80%, v/v, lactose solution at 11%; 20%, v/v, egg yolk) up to a final concentration of 450 x 10⁶ sperm/ml, and subsequently cooled up to 15 °C during 60 min. For T15, after cooling at 24 °C, semen samples were kept cooled during additional 60 min until reaching 15 °C. At that temperature, samples were centrifuged at 800 x *g* during 10 min (SORVALL[®]RC6). After centrifugation, all the procedures were the same described above for T24. For both T24 and T15, cooling up to 5 °C was conducted during 90 min.

During the freezing process, four intracellular cryoprotectants were used: Glycerol² (C₃H₈O₃), N-Methylformamide³ (C₂H₅NO), N,N-Dimethylformamide⁴ (C₃H₇NO) and N,N-Dimethylacetamide⁵ (C₄H₉NO), with molecular weights of 92.09; 59.07; 73.10 and 87.12, respectively. Glycerol (GLY) was used at a final

² G 4094 - Merck

³ M 2769 - Sigma

⁴ D 4254 - Sigma

⁵ D 5511 - Sigma

concentration of 3% [63] and all the 3 amides at 5% final concentration. Therefore, the combination of cryoprotectants and centrifugation temperatures followed a 4 x 2 factorial design. The freezing extenders to be added at 5 °C were prepared with the cooling extender plus 1.5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste⁶ and the respective cryoprotectants up to the final concentration described above (v/v).

When the treatments reached 5 °C, 2 ml from each 50 ml tube were transferred to 15 ml conic tubes and then 1 ml of one of the four cryoprotectant extenders was added. Semen was stored in 0.5 ml straws so each straw would have 150×10^6 spermatozoa. Straws were frozen horizontally, 5 cm above the nitrogen vapor for 20 min, and stored in liquid nitrogen until thawing.

Experiment 2

Ten semen collections were conducted for each of the four males. Semen processing and cryopreservation procedures were identical to those described for experiment 1. The same two centrifugation temperatures were tested (15 °C e 24 °C). However, only the 3 amides (MF, DMF e DMA) were used as intracellular cryoprotectants for freezing, all tested in three distinct concentrations (3, 5 and 7%), thus composing a 3 X 3 X 2 factorial structure. The freezing extenders were added at 5 °C, including the cooling extender with the addition of 1.5% *Orvus Ex Paste* (Equex-Paste) up to the same final concentration mentioned above (v/v).

Thawing

In both experiments, the straws were thawed at 37 °C during 20 s, and resuspended in a conic tube containing 10 ml of BTS previously warmed to 37 °C (1:20, v/v) [47].

Sperm Motility and Membrane Integrity Analysis

Semen samples were incubated during 10 min in water bath at 37 °C and the sperm motility was evaluated by phase contrast optical microscopy at 200 x magnification [6,39].

After the evaluation of sperm motility, sperm membrane integrity was evaluated through fluorescence [22], using the Carboxifluorescein Diacetate⁷ (CFDA) and Propidium Iodide⁸ (IP) markers. The evaluation was conducted using an epifluorescent microscope (Olympus BX 51, America INC), through WU filter

⁶ Minitüb, Germany

⁷ C 5041 - Sigma

⁸ P 4170 - Sigma

excitation under 400x magnification. Two hundred spermatozoa were counted in the same slide and classified as intact (green fluorescence) or damaged (red fluorescence).

Both evaluations were performed by the same technician and were identical for both experiments.

Statistical Analysis

Experiment 1 evaluated the effects of the four cryoprotectants and the two centrifugation temperatures on sperm motility and membrane integrity, whereas Experiment 2 evaluated the effect of the use of the three amides as cryoprotectants, three different concentrations and the two centrifugation temperatures on the same dependent variables. Analysis of variance with repeated measures were used for statistical comparisons in both experiments, considering all potential interactions among independent variables. The subsequent comparisons among means were conducted through the Tukey's test. Additionally, Pearson's correlation coefficients were generated to evaluate the linear association between estimates of sperm motility by optical microscopy and sperm membrane integrity obtained by fluorescent markers. All analyses were performed with the same statistical program [57].

Results

Experiment 1

Post-thawing sperm motility did not differ ($P > 0.05$) between DMA (53.8%) and DMF (50.6%), but both those estimates were higher ($P < 0.05$) than those for MF (43.2%) and GLY (38.1%), which did not differ from each other ($P > 0.05$). Motility for samples centrifuged at 15 °C was higher ($P < 0.05$) than that observed for those in T24 (52.8% vs. 40.0%, respectively).

The sperm membrane integrity after thawing for DMA (50.9%) did not differ ($P > 0.05$) from that observed for DMF (47.9%), but it was higher ($P < 0.05$) than for MF and GLY (43.3% and 34.4%, respectively). Membrane integrity did not differ between DMF and MF, whereas GLY presented the lowest frequency of spermatozoa having intact membrane. Samples centrifuged at 15 °C presented a higher percent of spermatozoa having intact membranes ($P < 0.05$) than those centrifuged at 24 °C (49.0% vs. 39.3%, respectively). Estimates of sperm motility and membrane integrity presented a high positive correlation ($r = 0.92$, $P < 0.0001$).

Experiment 2

There was a significant cryoprotectant by concentration interaction influencing both sperm motility and membrane integrity post-thawing ($P < 0.05$), as shown in Table 1. Samples conditioned in DMA at 5% presented higher motility and membrane integrity ($P < 0.05$) than those extended in MF at any concentration, DMF at 7% and DMA at 3%. There was a high positive correlation ($r = 0.92$, $P < 0.0001$) between estimates of sperm motility and membrane integrity.

Table 1: Post-thawing sperm motility and membrane integrity according to cryoprotectant and concentration

| Cryoprotectant | Concentration (%) | Motility (% \pm SE) | Membrane integrity (% \pm SE) |
|----------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| DMA | 3 | 46.6 \pm 2,1 ^{bc} | 45.2 \pm 2,6 ^{bcd} |
| | 5 | 53.8 \pm 1,7 ^a | 50.9 \pm 1,9 ^a |
| | 7 | 48.9 \pm 2,3 ^{abc} | 46.7 \pm 2,7 ^{abc} |
| DMF | 3 | 47.9 \pm 1,8 ^{abc} | 46.3 \pm 2,2 ^{bcd} |
| | 5 | 50.6 \pm 1,9 ^{ab} | 47.9 \pm 2,1 ^{ab} |
| | 7 | 44.1 \pm 2,0 ^c | 42.3 \pm 2,3 ^d |
| MF | 3 | 44.3 \pm 1,9 ^c | 43.4 \pm 2,2 ^{cd} |
| | 5 | 43.2 \pm 2,4 ^c | 43.3 \pm 2,5 ^{cd} |
| | 7 | 34.8 \pm 2,1 ^d | 34.7 \pm 2,5 ^e |

Means followed by distinct superscripts differ by $P < 0.05$

The centrifugation temperature also influenced sperm motility after thawing, being higher ($P < 0.05$) in T15 (51.8%) than in T24 (40.3%). Sperm membrane integrity in T15 was higher ($P < 0.05$) than in T24 (49.8% and 39.3%, respectively).

Discussion

This study indicates that amides, especially DMA and DMF, can successfully replace glycerol as intracellular cryoprotectants for frozen boar semen, as reported in equine [19,40,56,61], roosters [60], fish [31,43], geese [37] and rabbits [21]. The best motility results obtained in this study are comparable to those obtained by other authors [10,13,14,16,20,24,52,54,64], and close to some of the best results obtained with frozen boar semen [38]; all those results obtained using glycerol as

cryoprotectant. Glycerol is an alcohol that contains three functional hydroxyl groups, which can accept one hydrogen from the water molecule in six different binding sites, decreasing formation of ice crystals [12]. However, in some concentrations, glycerol has a potential cytotoxic effect [1,25,62]. In boar semen cryopreservation protocols, the final maximum concentration of glycerol is commonly 3% [13,30,38,52,63]. Also, glycerol hydroxyl radicals may bind among them, decreasing the probability of binding with water molecules, which is an undesirable characteristic related to increased viscosity [32]. The replacement of the hydroxyl groups with carboxyl (-OCH₃) conferred lower viscosity and better binding activity, but the resulting substance presented high cellular toxicity [65]. On the other hand, amides are formed by two functional groups: one amine (containing nitrogen); and one carboxylic acid (containing oxygen). The cryoprotectant action of the amides can be attributed to their molecular structure and to their ability to permeate the cell membrane, since their functional groups bind to the hydrogen from the water molecules in three sites. So, amides likely bind to water molecules more efficiently than glycerol [4,32]. Furthermore, due to their lower molecular weight and viscosity in comparison to glycerol, amides have higher membrane permeability, decreasing the possibilities of cellular damage caused by osmotic stress [4].

In our study, the use of DMA and DMF at 5% was associated with improved sperm motility and membrane integrity after thawing, in comparison with glycerol at 3%, which is the most common choice for boar semen freezing protocols. Also, results with DMA were better than those with MF, although DMF and MF presented similar results. Therefore, DMA could generally be considered more efficient than the other tested amides, especially considering the results observed for sperm membrane integrity. DMA is largely used as cryoprotectant in fish [8,43,44] and poultry [60] semen freezing protocols, being associated with benefits for the post-thawing response. In one study with poultry semen, the use of glycerol was related to lower frequency of morphologic sperm abnormalities than dimethylsulfoxide (Me₂SO) and DMA [60], but samples conditioned with DMA presented better post-thawing fertility than those conditioned with glycerol. Our results indicate that the concentration of 5% provided better results for sperm motility and membrane integrity after thawing, in comparison with 3%. When used in fish semen cryopreservation protocols, DMA concentrations vary from 10 to 15% [43].

The centrifugation temperature also influenced post-thawing sperm motility and membrane integrity. The better frequencies for both estimates were observed in T15, with longer exposure of sperm cells to both the seminal plasma and the extender. For T15, it was necessary to use a refrigerated centrifuge to stabilize the temperature; otherwise the heat generated during the centrifugation time would raise the temperature up to nearly 24 °C, which could reduce the efficiency of such protocol. The objective of using T24 was to optimize the protocol, using a non-refrigerated bench centrifuge, common in most laboratories, since after centrifugation at 24 °C, the temperature would remain stable. It is possible that better results could be obtained with T24, if samples could be kept for at least 90 additional minutes at the same temperature until centrifuged, so the total time from the semen collection to centrifugation would be similar to T15.

Most of the boar semen freezing protocols currently used are based on modifications of two methods: in the first one, the seminal plasma is removed by centrifugation, immediately after the ejaculate collection [45]; whereas in the second, the seminal plasma is removed only when the freezing curve reaches 15 °C [63]. The influence of seminal plasma on sperm quality is controversial since its presence may be associated with higher sensitivity to cold shock [51] and its removal may have no effect in post-thaw viability [53]. Also, no influence of the presence of seminal plasma on semen quality was observed when seminal plasma was added to the sperm rich fraction of the ejaculate [29]. In studies with mini-pigs, it was concluded that seminal plasma contains factors that modify the sperm cell before freezing, reducing its ability to penetrate oocytes *in vitro*, after freezing [33]. Deleterious effects of the presence of seminal plasma, were also reported for semen stored for at least 6 h before cryopreservation [42]. On the other hand, beneficial effects related to the presence of seminal plasma proteins were reported in many studies [9,17,35,48]. Some authors [28] report that bulls having different levels of response with frozen semen would have differences in the protein content of their seminal plasma, suggesting that such proteins could be markers related to semen freezability. Such differences may be related to individual differences in freezability [26], as well as genetic influences, as observed in boars [58,59].

The correlations between motility and membrane integrity observed in this study are in agreement with those reported by other authors [15].

The results of this study indicate that the use of DMA and DMF as cryoprotectants at the concentration of 5% and centrifuged at 15 °C provided sperm motility and membrane integrity similar or superior to those observed using glycerol at 3%.

References

- [1] T. Almilid, L.A. Johnson. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws, *J. Anim. Sci.* 66 (1988) 2899-2905.
- [2] M.A. Alvarenga, J.K. Graham, S.L. Keith, F.C. Landim-Alvarenga, S.L. Squires. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 14, 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.157.
- [3] I. Babiak, J. Glogowski, K. Goryczko, S. Dobosz, H. Kuzminski, J. Strzezek, W. Demianowicz. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa, *Theriogenology* 56 (2001) 177-192.
- [4] B.A. Ball, A. Vo. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential, *J. Androl.* 22 (2001) 1061-1069.
- [5] H.J. Bearden, J.W. Fuquay. Semen collection. In: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Eds.), *Applied Animal Reproduction*. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp. 147-157.
- [6] H.J. Bearden, J.W. Fuquay. Semen evaluation. In: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Eds.), *Applied Animal Reproduction*. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp. 159-170.
- [7] M.M. Buhr, L. He, V. Kasimanickam. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.61-69.
- [8] E. Cabrita, R. Alvarez, L. Anel, K.L. Rana, M.P. Herraes. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm, *Cryobiology* 37 (1998) 245-253.
- [9] C. Castellini, P. Lattaioli, M. Moroni, A. Minelli. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.* 63 (2000) 275-282.
- [10] A. Córdova, J.F. Pérez-Gutiérrez, B. Lleó, C. García-Artiga, V. Alvarez, A. Drobchak, S. Martín-Rillo. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws, *Theriogenology* 57 (2002) 2119-2128.

- [11] M.N. Corrêa, T.Jr. Lucia, J.C. Deschamps, C.G. Serret, J. Bordignon, G. Rambo. Rate of penetration in vitro of oocytes swines using spermatozoa conditioned with extender PIGPEL-5 at 5°C, *Rev Bras Reprod Animal* 28 (2004) 161-169.
- [12] A.M. Dalimata, J.K. Graham. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose, *Theriogenology* 49 (1997) 831-841.
- [13] B.M. Eriksson, H. Petersson, H. Rodriguez-Martinez. Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container, *Theriogenology* 58 (2002) 1065-1079.
- [14] B. Eriksson, H. Petersson, H. Rodriguez-Martinez. Individual boar fertility after AI with frozen-thawed semen in relation to in vitro sperm motility and viability. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6, 2001, Missouri-Columbia. **Proceedings...** Missouri-Columbia, 2001, p.54.
- [15] L. Fraser, K. Gorszczaruk, J. Strzezek. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality, *Reprod. Dom. Anim.* 36 (2001) 325-329.
- [16] P. Garcia Casado, Del Val P. Marigorta, C. Diaz Yubero, R. Sánchez Sánchez, F. Sáiz Cidoncha. Influence of equilibration time on boar spermatozoa membranes during the freezing process. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6, 2001, Missouri-Columbia. **Proceedings...** Missouri-Columbia, 2001, p.52.
- [17] D.L. Garner, C.A. Thomaz, C.G. Gravance, C.E. Marshall, J.M. Dejarnette, C.H. Allen. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm, *Theriogenology* 56 (2001) 31-40.
- [18] R.J. Gerrits, J.K. Lunney, L.A. Johnson, V.G. Pursel, R.R. Kraeling, G.A. Rohrer, J.R. Dobrinsky. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations, *Theriogenology* 63 (2005) 283-299.
- [19] J.K. Graham. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 14, 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.307.
- [20] H.D. Guthrie, G.R. Welch. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm, *Theriogenology* 63 (2005) 396-410.

- [21] A. Hanada, H. Nagase. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.* 60 (1980) 247-252.
- [22] R.A.P. Harrison, S.E. Vickers. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.* 88 (1990) 343-352.
- [23] M.A. Hay, W.A. King, C.J. Gartley, S.P. Leibo, K.L. Goodrowe. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs, *J. Reprod. Fertil.* 51 (1997) 99-108.
- [24] W.V. Holt, A. Medrano, L.M. Thurston, P.F. Watson. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope, *Theriogenology* 63 (2005) 370-382.
- [25] W.V. Holt. Basic aspects of frozen storage of semen, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 3-22.
- [26] W.V. Holt. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences, *Theriogenology* 53 (2000) 47-58.
- [27] R.S. Jeyendran, H.H. Van Der Ven, M. Perez-Pelaez, L.J. Zaneveld. Nonbeneficial effects of glycerol on the oocyte penetrating capacity of cryopreserved and incubated human spermatozoa, *Cryobiology* 22 (1985) 434-437.
- [28] M.I.M. Jobim, E.R. Oberst, C.G. Salbego, D.O. Souza, V.B. Wald, F. Tramontina, R.C. Mattos. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability, *Theriogenology* 61 (2004) 255-266.
- [29] L.A. Johnson, K.F. Weitze, P. Fiser, W.M.C. Maxwell. Storage of boar semen, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 143-172.
- [30] L.A. Johnson. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1985, p.199-222.
- [31] L.A. Johnson, K. Larsson. International conference on deep freezing of boar semen. Uppsala, 1985, 310p.
- [32] A.M. Karow. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists.* Augusta, Georgia, USA, 2001.
- [33] N. Kawano, M. Shimada, T. Terrada. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing, *Theriogenology* 61 (2004) 351-364.

- [34] C.E. Kuster, G.C. Althouse. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-Cell™ extenders, *Theriogenology* 52 (1999) 365-376.
- [35] F. Lahnsteiner, N. Mansour, B. Berger. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, *Theriogenology* 62 (2004) 801-808.
- [36] D.G. Levis. Liquid boar semen production: current extender technology and where we go from here. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.121-128.
- [37] E. Lukaszewicz. An effective method for freezing White Italian Garder semen, *Theriogenology* 58 (2002) 19-27.
- [38] A. Maldjian, F. Pizzi, T. Gliozzi, S. Cerolini, P. Penny, R. Noble. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, *Theriogenology* 63 (2005) 411-421.
- [39] L. Malmgren. Assessing the quality of raw semen: a review, *Theriogenology* 48 (1997) 523-530.
- [40] A.S.L. Medeiros, G.M. Gomes, M.T. Carmo, F.O. Papa, M.A. Alvarenga. Cryopreservation of stallion sperm using different amides, *Theriogenology* 58 (2002) 273-276.
- [41] C.M.O. Medeiros, F. Forell, A.T.D. Oliveira, J.L. Rodrigues. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, *Theriogenology* 57 (2002) 327-344.
- [42] A.I. Moore, E.L. Squires, J.K. Graham. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa, *Theriogenology* 63 (2005) 2372-2381.
- [43] B. Ogier De Baulny, C. Labbé, G. Maisse. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants, *Cryobiology* 39 (1999) 177-184.
- [44] B. Ogier De Baulny, Y. Le Verne, D. Kerboeuf, G. Maisse. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, *Cryobiology* 34 (1997) 141-149.
- [45] M. Paquignon, D. Mergounis, M. Courot, F. Du Mesnil Du Buisson. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro, *J. Rech. Porcine France* 6 (1974) 71-76.

- [46] F.J. Peña, F. Saravia, I. Núñez-Martínez, A. Johannisson, M. Wallgren, H. Rodríguez-Martínez. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim. Reprod. Sci.* (2006) *Articles In Press*.
- [47] F.J. Peña, A. Johannisson, M. Wallgren, H. Rodríguez-Martínez. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity, *Theriogenology* 60 (2003) 677-689.
- [48] R. Pérez-Pé, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa, *Theriogenology* 56 (2001) 425-434.
- [49] J.J. Phillips, R.K. Bramwell, J.K. Graham. Cryopreservation of rooster sperm using methylcellulose, *Poultry Sci.* 75 (1996) 915-923.
- [50] V.G. Pursel, L.A. Johnson. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, *J. Anim. Sci.* 40 (1975) 99-102.
- [51] V.G. Pursel, L.A. Johnson, G.B. Rampacek. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock, *J. Anim. Sci.* 34 (1972) 278-283.
- [52] J. Roca, G. Carvajal, X. Lucas, J.M. Vazquez, E.A. Martínez. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa, *Theriogenology* 60 (2003) 77-87.
- [53] S. Salamon. Deep freezing of boar semen III. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa, *Austr. J. Biol. Sci.* 26 (1973) 239-247.
- [54] F. Saravia, M. Wallgren, S. Nagy, A. Johannisson, H. Rodríguez-Martínez. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability, *Theriogenology* 63 (2005) 1320-1333.
- [55] T.J. Sexton. Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa, *Poultry Sci.* 54 (1975) 845-848.
- [56] E.L. Squires, S.L. Keith, J.K. Graham. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa, *Theriogenology* 62 (2004) 1056-1065.
- [57] STATISTIX®. Statistix for Windows User's Manual. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.

- [58] L.M. Thurston, K. Siggins, A.J. Mileham, P.F. Watson, W.V. Holt. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 545-554.
- [59] L.M. Thurston, P.F. Watson, A.J. Mileham, W.V. Holt. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation, *J. Androl.* 22 (2001) 382-394.
- [60] K. Tselutin, F. Seigneurin, E. Blesbois. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa, *Poultry Sci.* 78 (1999) 586-590.
- [61] M. Vidament, C. Daire, J.M. Yvon, P. Doligez, B. Bruneau, M. Magistrini, P. Ecot. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide, *Theriogenology* 58 (2002) 249-251.
- [62] P.F. Watson. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim. Reprod. Sci.* 60 (2000) 481-492.
- [63] P. Westendorf, L. Richter, H. Treu. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren, *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 82 (1975) 261-267.
- [64] T. Wongtawan, F. Saravia, M. Wallgren, I. Caballero, H. Rodríguez-Martínez. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses, *Theriogenology* 65 (2006) 773-787.
- [65] B. Wowk, M. Darwin, S.B. Harris, S.R. Russel, C.M. Rash. Effects of solutes methoxilation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions, *Cryobiology* 39 (1999) 215-227.

5. ARTIGO III: Efeito do uso de gema de ovo e lipoproteína de baixa densidade na criopreservação de sêmen suíno

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em comparação com o uso de gema de ovo, na composição dos diluidores de resfriamento e congelamento de sêmen suíno. Foram avaliados parâmetros espermáticos *in vitro*, de sêmen de seis machos suínos submetidos ao congelamento-descongelamento. O uso de gema de ovo na composição dos diluidores determinou após o descongelamento maior motilidade espermática (53,7 x 37,3%, $P < 0,05$), e maior integridade de membrana avaliada pela fluorescência (49,0 x 43,7%, $P < 0,05$). A integridade de membrana avaliada pelo choque hiposmótico não diferiu ($P > 0,05$) entre gema (32,7%) e LDL (30,2%). O uso de gema de ovo foi o crioprotetor extracelular mais eficiente na composição dos diluidores de resfriamento e congelamento utilizados para sêmen suíno.

Palavras-Chaves: Crioprotetor extracelular, Lipoproteína de baixa densidade, Sêmen, Suíno.

Summary

The aim of this study was to compare the use of low density lipoprotein (LDL) and of egg yolk, in the composition of cooling and freezing extenders for boar semen. Parameters of semen quality of six boars were evaluated *in vitro* after thawing. Extenders having egg yolk presented better post-thawing motility (53.7 x 37.3%, $P < 0.05$) and membrane integrity evaluated by fluorescence (49.0 x 43.7%, $P < 0.05$). Membrane integrity evaluated by hypoosmotic swelling test did not differ ($P > 0.05$) between egg yolk (32.7%) and LDL (30.2%). The extender including egg yolk was more efficient than that using LDL as a nonpenetrating cryopreservation for boar semen.

Key-Words: Nonpenetrating cryoprotectants, Low density lipoprotein, Semen, Swine.

Introdução

O congelamento do sêmen é uma biotécnica reprodutiva importante para aumentar a eficiência de produção dos rebanhos, especialmente devido ao uso em maior escala nos programas de inseminação artificial (IA) de animais geneticamente superiores (GERRITS *et al.*, 2005). No entanto, a expansão da IA em suínos tem sido limitada devido à baixa fertilidade da célula espermática de suínos após o descongelamento. A criopreservação do sêmen suíno implica na diminuição da fertilidade (PARKS e GRAHAN, 1992), possivelmente devido a danos provocados nas membranas celulares (WATSON e PLUMMER, 1985; MAXWELL e JOHNSON, 1997). A integridade estrutural e funcional das membranas são, portanto, fundamental para a viabilidade do espermatozóide.

A gema de ovo é amplamente utilizada nos protocolos de congelamento de sêmen. Sua ação crioprotetora é devido à fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Vários estudos têm demonstrado que a LDL pode aumentar a resistência espermática contra o choque térmico, melhorar a motilidade, a integridade do acrossoma e da membrana plasmática (GRAHAM e FOOTE, 1987; DEMANIOWICZ e STRZEZEK, 1996; MOUSSA *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2006). Evidências têm mostrado que os danos espermáticos resultantes do processo de congelamento-descongelamento podem ser minimizados pelos crioprotetores e pelas curvas de resfriamento otimizadas (JOHNSON *et al.*, 2000).

Trabalhos com o uso de LDL, na composição de diluentes utilizados para sêmen foram em diferentes espécies. A substituição da gema de ovo por LDL foi benéfica para a manutenção da qualidade espermática em sêmen de cães, quando preservado a temperatura de refrigeração a 5°C ou congelado (VARELA JUNIOR, 2005). Enquanto que, LDL na concentração de 8%, pode substituir a gema de ovo na composição do diluente utilizado para criopreservar sêmen eqüino (MARTIN, 2005). A ação crioprotetora da LDL purificada da gema de ovo (MOUSSA *et al.*, 2002) na preservação de espermatozoides suínos foi estudada por DEMANIOWICZ e STRZEZEK (1996), com o uso de sêmen refrigerado, portanto, em estado líquido. HU *et al.* (2006), encontraram que LDL na concentração de 9% foi benéfica para manutenção de parâmetros de avaliação seminal de sêmen suíno congelado.

O objetivo deste trabalho foi comparar o uso de gema de ovo e de LDL, na composição dos diluidores de resfriamento (DR) e congelamento (DC) utilizados na

criopreservação de sêmen suíno, sobre parâmetros de avaliação espermática *in vitro* de sêmen congelado-descongelado.

Material e Método

Foram utilizados seis machos suínos cruzados (Landrace x Large White), com aproximadamente 18 meses de idade, que apresentavam fertilidade conhecida e que eram mantidos em baias individuais sob as mesmas condições ambientais, na Estação Experimental da Palma, Universidade Federal de Pelotas. Para cada macho foram realizadas 10 coletas, feitas através do método da mão-enluvada (BEARDEN e FUQUAY, 1997a), usando um copo plástico recoberto por gaze protegido por um copo isotérmico, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel. Somente foram utilizados neste estudo, ejaculados com motilidade maior que 80% no momento da coleta.

Imediatamente após a coleta do sêmen, para cada macho foram coletadas duas alíquotas de 20 ml da fração rica em espermatozóides (SPTZ), sendo diluídas (1:1, v/v) em tubo cônico de 50 ml com BTS (LEVIS, 2000).

O método de congelamento foi o descrito por Westendorf *et al.* (1975) e Bordignon *et al.* (1996), com modificações feitas por Bianchi *et al.* (2006a; 2006b). O tratamento utilizado como controle foi preparado utilizando-se a gema de ovo como crioprotetor extracelular. Na curva de resfriamento, após a diluição inicial, os frascos permaneciam 60 min a 24 °C e, após, 60 min a 15 °C. Ao atingirem 15 °C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 min), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de SPTZ obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (DR) GEMA utilizado como controle (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20% gema de ovo, v/v) e no DR LDL (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20% LDL, v/v), para uma concentração de 450×10^6 SPTZ/ml. A LDL foi obtida através de protocolo descrito por Moussa *et al.* (2002). Após realizou-se o resfriamento por 90 min a 5 °C. Os tratamentos GEMA e LDL foram re-suspenso quando atingiram 5 °C no diluidor de congelamento GEMA a base do crioprotetor intracelular dimetilacetamida (DMA) (83,5% de DR GEMA + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 15% DMA, v/v) e no diluidor de congelamento LDL também a base do crioprotetor DMA (83,5% de DR LDL + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 15% DMA, v/v). As concentrações finais foram de 300×10^6 SPTZ/ml e 5% de DMA.

Após a adição do diluidor de congelamento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, com 150×10^6 SPTZ/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 20 min, sendo após armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C. O descongelamento das palhetas foi realizado a 37 °C por 20 s em banho-maria com circulação de água. As palhetas foram re-suspensas (1:20, v/v) em tubos cônicos de 15 ml (PEÑA *et al.*, 2003), no diluente BTS incubado a 37 °C.

Os valores de pH e osmolalidade do sêmen e diluidores utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de pH e osmolalidade do sêmen e diluidores utilizados.

| Item avaliado | Valor obtido | |
|-------------------------------|--------------|--|
| | pH | Osmolalidade, mOsm/kg H ₂ O |
| Sêmen | 7,3 | 307 |
| BTS | 7,2 | 357 |
| Diluidor de resfriamento GEMA | 6,1 | 381 |
| Diluidor de resfriamento LDL | 6,1 | 431 |
| Diluidor de congelamento GEMA | 6,8 | 3.337 |
| Diluidor de congelamento LDL | 6,6 | 3.323 |

A avaliação da motilidade espermática foi realizada através de microscopia ótica (200 x), 10 min após o descongelamento (BEARDEN e FUQUAY, 1997b). Após a avaliação da motilidade foi feita à avaliação da integridade de membrana plasmática dos SPTZ por fluorescência (HARRISON e VICKERS, 1990), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP). A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 100 espermatozóides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (espermatozóides corados em verde em toda sua extensão) e lesados (espermatozóides corados em vermelho).

A integridade funcional da membrana espermática foi testada também através do teste do choque hiposmótico (CHIPO) (VASQUEZ *et al.*, 1997). A avaliação foi feita utilizando-se câmara de Neubauer e microscopia ótica com contraste de fases, em aumento de 400x, procedendo-se à contagem de 100

células, registrando o número de células que apresentavam cauda do espermatozóide normal em relação àquelas que estavam dobrada ou enrolada. O valor que foi utilizado para análise do CHIPO, correspondeu à diferença obtida entre o número de espermatozoides com cauda dobrada e enrolada, observadas no teste realizado com a solução hiposmótica (0 mOsm/kg) e isosmótica (312 mOsm/kg).

As variáveis dependentes consideradas foram: percentual de motilidade, espermatozoides com membrana íntegra no descongelamento no teste da fluorescência e para o CHIPO. Foi gerada análise de variância pelo modelo linear através de medidas repetidas, a fim de isolar o efeito de cada coleta e de cada macho sobre os parâmetros avaliados. A comparação de médias foi feita no teste de Tukey. Todas as análises foram através do programa Statistix® (2004).

Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações de motilidade, SPTZ com membrana íntegra na fluorescência e membrana reagida no choque hiposmótico após o descongelamento, estão apresentados na Tabela 2. O uso de gema de ovo na composição dos diluidores de congelamento e resfriamento proporcionou melhores resultados ($P < 0,05$) após o congelamento para motilidade e integridade de membrana avaliada por fluorescência em relação ao uso de LDL, mas não diferiu ($P > 0,05$) na integridade de membrana pelo choque hiposmótico.

Tabela 2. Resultados de motilidade e integridade de membrana do sêmen descongelado.

| Avaliação | GEMA | LDL |
|---|-------------------|-------------------|
| Motilidade, % | 53,7 ^a | 37,3 ^b |
| SPTZ com membrana íntegra na fluorescência, % | 49,0 ^a | 43,7 ^b |
| SPTZ com cauda reagida no choque hiposmótico, % | 32,7 ^a | 30,2 ^a |

^{a, b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

A complexidade estrutural da membrana espermática, bem como, a etapa durante o processo de congelamento que mais altera a dinâmica estrutural da membrana e como os componentes crioprotetores interagem com esta, ainda não estão bem esclarecidos. Isso dificulta a adoção de medidas com o objetivo de

melhor proteger a membrana durante o processo de criopreservação (PARKS e GRAHAM, 1992).

Moussa *et al.* (2002), determinaram a inclusão de LDL em 8% para o congelamento de sêmen de touro. Estudos de criopreservação de sêmen de cães (VARELA JÚNIOR, 2005) e de garanhão (MARTIN, 2005), também estabeleceram a utilização de 8% de LDL. Trabalho com uso de LDL na criopreservação de sêmen suíno foi realizado por Hu *et al.* (2006). Esses autores encontraram que a concentração de 9% de LDL determinou os melhores resultados de motilidade e integridade de acrossoma e membrana.

O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteína de baixa densidade. É mencionado que a LDL pode se aderir à membrana celular durante o processo de preservação espermática (GRAHAM e FOOT, 1987), promovendo uma película interfacial entre os ácidos graxos da membrana e a água (ANTON *et al.*, 2003). Além disso, a LDL permite a entrada de fosfolípido e colesterol na membrana, formando um complexo com as proteínas do plasma seminal que previne a saída de fosfolípido e colesterol da membrana espermática (MANJUNATH *et al.*, 2002; BERGERON *et al.*, 2004).

Neste estudo, o percentual de inclusão de LDL no diluidor de resfriamento foi de 6% enquanto que no diluidor de congelamento foi de 5%. Dessa forma, o uso de LDL nos diluidores em substituição a gema de ovo, possivelmente não influenciou a viabilidade espermática devido à baixa inclusão do crioprotetor, em relação aos 9% estabelecidos em outro trabalho (HU *et al.*, 2006).

He *et al.* (2001), obtiveram redução na sensibilidade de espermatozóides suínos submetidos a criopreservação, através da incorporação de microvesículas de lipídios específicos na forma de lipossomas. Além disso, Bergeron *et al.* (2004), demonstraram, que o tempo mínimo de incubação do sêmen com LDL deve ser de 4 h, a fim de que a lipoproteína possa interagir com a membrana celular.

Dessa forma, além do baixo percentual de inclusão de LDL neste estudo, o uso da molécula complexa de lipoproteína ao invés do uso de microvesículas e o curto período de incubação do sêmen na presença dos diluidores com LDL, 1,5 h ao invés das 4 h preconizadas, são as hipóteses para que não tenha se observado os benefícios crioprotetores da fração de lipoproteína.

Os métodos de avaliação utilizados permitem avaliação da viabilidade espermática. No entanto, não permitem uma análise mais detalhada sobre a real

ação dos tratamentos sobre a membrana celular, sugerindo desta forma, o emprego de métodos ultra-estruturais mais específicos para verificar esse efeito.

Conclusão

Neste estudo o uso de gema de ovo ao invés de LDL como crioprotetor extracelular na composição dos diluidores de resfriamento e congelamento, proporcionou melhores resultados de motilidade e integridade de membrana plasmática de espermatozóides suínos criopreservados.

Referências

- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M.; BEAUMAL, V.; DAVID-BRIAND, E.; RABESONA, H. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, 83, 175-183, 2003.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997a. Cap. 14, p.147-157.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997b. Cap. 15, p.159-170.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**. 70, 708-717, 2004.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Uso de diferentes crioprotetores no congelamento de sêmen suíno. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006a, CD-ROM.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORRÊA, E.K.; PERONDI, A.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Congelamento de sêmen suíno usando amidas em diferentes concentrações. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006b, CD-ROM.
- BORDIGNON, V.; DESCHAMPS, J.C.; SECHIN, A.; PALUDO, G.; VIVIAN, J.C.; NICOLA, E.; BOZZATO, J.S.; GONSALES, J. A.; PIMENTEL, C.A. Effect of trehalose on motility, acrosome and fertility of the frozen-thawed boar semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 20, 54-62, 1996.
- DEMANIOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**. 31, 279-280, 1996.
- GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**. 63, 283-299, 2005.

- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, 24, 42-52, 1987.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, **Journal Reproductive Fertility**. 88, 343-352, 1990.
- HE, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**. 64, 69-79, 2001.
- HU, J.-H.; LI, Q.-W.; LI, G.; CHEN, X.-Y.; YANG, H.; ZHANG, S.-S.; WANG, L.-Q. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Asian-Aust. Journal of Animal Science**. 19, 486-490, 2006.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**. 62, 143-172, 2000.
- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.121-128.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major Proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology Reproduction**. 67, 1250-1258, 2002.
- MARTIN, C.E.G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**. 48, 209-219, 1997.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen **Theriogenology**. 57, 1695-1706, 2002.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**. 38, 209-223, 1992.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**. 60, 677-689, 2003.

STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.

VARELA JUNIOR, A.S. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, 47, 913-922, 1997.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1985, p.113-127.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr.** 82, 261-267, 1975.

6. ARTIGO IV: Inseminação artificial pós-cervical de leitoas com sêmen suíno criopreservado utilizando dimetilacetamida e glicerol

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da dimetilacetamida (DMA) e glicerol na criopreservação de sêmen suíno, sobre resultados de fertilização *in vivo*. Foram sincronizadas 60 leitoas pré-púberes e inseminadas com o uso de sêmen congelado com glicerol 3% (30 fêmeas) e DMA 5% (30 fêmeas). O método de inseminação utilizado foi o pós-cervical, com concentração de 1×10^9 espermatozoides viáveis por dose. Após 36 a 40 h da inseminação, as fêmeas foram abatidas e realizada a contagem de corpos hemorrágicos (CH) nos ovários. Foi realizada a lavagem dos ovidutos das fêmeas, verificando o número de estruturas recuperadas (oócitos e embriões), calculando-se as taxas de concepção e fertilização. A média de CH nas fêmeas do grupo glicerol 3% não diferiu ($P > 0,05$) daquelas do grupo DMA 5% (10,4 x 10,2, respectivamente). Não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de recuperação de estruturas entre os grupos glicerol 3% (68,9%) e DMA 5% (66,9%). Os resultados obtidos nos grupos glicerol 3% e DMA 5% para as taxas de concepção (73,3 x 76,6%) e fertilização (48,6 x 59,4%) não apresentaram diferença ($P > 0,05$). Os resultados obtidos indicam o uso de DMA 5% como um substituto potencial ao glicerol 3% nos protocolos de congelamento de sêmen suíno.

Palavras-Chaves: Inseminação artificial, Congelamento, Amidas, Glicerol, Suínos.

Summary

The objective of this study was to evaluate the use of dimethylacetamide (DMA) in boar semen cryopreservation fertilization *in vivo*. Sixty pre-pubertal gilts were synchronized and inseminated with semen including either glycerol 3% or DMA 5% as cryoprotectants (n = 30 for both groups). Artificial insemination was conducted with the intrauterine method using doses with 1×10^9 viable spermatozoa. The gilts were slaughtered 36-40 h after the insemination and the hemorrhagic bodies (CH) in the ovaries were counted. The oviducts were washed, so oocytes and embryos could be recovered to determine the conception and fertility rates. The average CH obtained with glycerol 3% did not differ ($P > 0.05$) from those observed with DMA (10.4 x 10.2, respectively). Recovery rates also did not differ ($P > 0.05$) between groups (68.9% with glycerol and 66.9% with DMA). Conception (73.3 x 76.6%) and fertility rate (48.6 x 59.4%) were also similar ($P > 0.05$) for glycerol and DMA, respectively. Those results indicate that DMA 5% can replace glycerol 3% in the composition of extenders for frozen boar semen.

Key-Words: Artificial Insemination, Cryopreservation, Amides, Glycerol, Swine.

Introdução

Na espécie suína os primeiros animais produzidos por inseminação artificial (IA) com sêmen congelado só foram obtidos em 1970 (POLGE *et al.*, 1970), cerca de 20 anos após a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol sobre gametas (POLGE *et al.*, 1949). No entanto, o uso de sêmen suíno congelado determina a queda de 20 a 30% nos resultados de taxa de parição e dois a três leitões a menos por leitegada (JOHNSON, 1985). Dessa forma, a sua utilização fica condicionada apenas em situações específicas, tais como a produção de reprodutores em núcleos genéticos (CRABO, 1990). A grande sensibilidade do espermatozóide (SPTZ) ao choque térmico é o que impede a utilização em maior escala do sêmen congelado nesta espécie.

O glicerol é normalmente o crioprotetor de eleição para o congelamento de sêmen na maioria das espécies de mamíferos. Estudos com a utilização de crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos com obtenção de bons resultados, especialmente em eqüinos com o uso de diferentes amidas (ALVARENGA *et al.*, 2000; GRAHAN, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002; VIDAMENT *et al.*, 2002). Amidas também são utilizadas nos protocolos de congelamento de sêmen de aves (LUKASZEWICZ *et al.*, 2004) e de peixes (OGIER DE BAULNY *et al.*, 1999). A superioridade do uso de dimetilacetamida em relação ao glicerol sobre parâmetros de avaliação *in vitro* de sêmen suíno congelado, foi demonstrada por Bianchi *et al.* (2006a; 2006b).

O uso de sêmen congelado através da IA intracervical, normalmente são utilizadas doses de $5-6 \times 10^9$ SPTZ (BORDIGNON *et al.*, 1996; ROCA *et al.*, 2003), o que é consideravelmente superior a dose convencional de 3×10^9 SPTZ utilizada com sêmen refrigerado (SERRET *et al.*, 2005). Alguns trabalhos têm apresentado promissores resultados de fertilidade utilizando sêmen suíno congelado (ERIKSSON *et al.*, 2002; ROCA *et al.*, 2003; ROCA *et al.*, 2006). A melhora nos resultados obtidos é resultante da adaptação de protocolos de criopreservação, além do desenvolvimento de novos métodos de IA, tais como o intra-uterino profundo, utilizando doses de até 150×10^6 SPTZ. Outro método de IA que tem sido testado, especialmente com o emprego de sêmen refrigerado, é o pós-cervical (WATSON e BEHAN, 2002; BENNEMANN *et al.*, 2004; SERRET *et al.*, 2005), através do qual tem se alcançado sucesso com emprego de doses de 1×10^9 SPTZ. Martinez *et al.*, (2006), comparando IA intra-uterina profunda em relação ao método convencional

intracervical encontraram 21% de fertilizações unilaterais, associadas ao método intra-uterina profunda, ainda que tivessem utilizado sêmen refrigerado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da dimetilacetamida (DMA) e glicerol na criopreservação de sêmen suíno, sobre as taxas de concepção e fertilização *in vivo*, utilizando inseminação artificial pós-cervical.

Material e Método

Coleta de sêmen

Foi utilizado sêmen de um macho suíno cruzado (Landrace x Large White), com aproximadamente 24 meses de idade, que apresentava fertilidade conhecida, estava em regime rotineiro de coleta e era mantido em baia individual na Estação Experimental da Palma (Universidade Federal de Pelotas). O ejaculado foi coletado através do método da mão-enluvada (BEARDEN e FUQUAY, 1997a), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel que era descartada. A condição mínima para o ejaculado ser processado foi de motilidade espermática e integridade de membrana por fluorescência superior a 80% e 70%, respectivamente no momento da coleta.

Processamento do ejaculado e criopreservação

Imediatamente após a coleta do sêmen, a fração rica em espermatozóides (SPTZ) foi diluída (1:1, v/v), em tubo em BTS (LEVIS, 2000). O método de congelamento utilizado foi o descrito por Westendorf *et al.* (1975) e Bordignon *et al.* (1996), com modificações feitas por Bianchi *et al.* (2006a, 2006b). A curva de resfriamento após a diluição inicial foi de 60 min a 24 °C e, após, 60 min a 15 °C. Ao atingir 15 °C, foi realizada a centrifugação (800 x *g* por 10 min), para a retirada do plasma seminal. O sedimento de espermatozóides (SPTZ) obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (DR) GEMA (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20% gema de ovo, v/v), num volume suficiente para que cada ml mantivesse uma concentração de 450×10^6 de SPTZ. Após realizou-se o resfriamento por 90 min até 5 °C, quando foi re-suspenso nos diluidores de congelamento (DC) a base dos crioprotetores Glicerol⁹ (C₃H₈O₃) e N,N-Dimetilacetamida¹⁰ (C₄H₉NO), com pesos moleculares de 92,09; e 87,12, respectivamente.

⁹ G 4094 - Merck

¹⁰ D 5511 - Sigma

Os DC foram elaborados a partir do DR, sendo o DC composto de glicerol (89,5% de DR GEMA + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 9% de Glicerol, v/v), e o DC dimetilacetamida (83,5% de DR GEMA + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 15% de DMA, v/v).

A quantidade de DC acrescentada foi de 1:2, ou seja, para cada 2 ml de sêmen com DR foi adicionado 1 ml de DC. Nesta proporção obteve-se uma concentração final de 3% para o congelamento com glicerol (WESTENDORF *et al.*, 1975) e a 5% para DMA (BIANCHI *et al.*, 2006a; 2006b).

Em seguida a adição do DC o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, contendo a concentração de 150×10^6 SPTZ/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido, 5 cm acima do nível do nitrogênio, a uma temperatura aproximada de -90 °C por um período de 20 min, sendo após mergulhadas em nitrogênio líquido a -196 °C e mantidas até o descongelamento.

Os valores de pH e osmolalidade do sêmen e dos diluidores utilizados no processamento para resfriamento e congelamento do sêmen estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de pH e osmolalidade do sêmen e diluidores utilizados.

| Item avaliado | Valor obtido | |
|--------------------------------------|--------------|--|
| | pH | Osmolalidade, mOsmol/kg H ₂ O |
| Sêmen | 7,5 | 302 |
| BTS | 6,9 | 332 |
| Diluidor de resfriamento Gema de Ovo | 6,1 | 351 |
| Diluidor de congelamento Glicerol | 6,7 | 1.990 |
| Diluidor de congelamento DMA | 6,7 | 3.343 |

Avaliações *in vitro* do sêmen descongelado

As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 20 s, sendo re-suspensas em tubo cônico contendo 10 ml de BTS previamente aquecido a 37 °C (1:20, v/v) (PEÑA *et al.*, 2003).

Motilidade

Após o descongelamento, foi feita a incubação em banho-maria a 37 °C por 10 min e avaliada a motilidade (0 a 100 %) através de microscopia ótica com contraste de fases em aumento de 200 x (BEARDEN e FUQUAY, 1997b).

Integridade de membrana espermática através de sonda fluorescente

Após a avaliação da motilidade e vigor foi feita a avaliação da integridade de membrana espermática por fluorescência (HARRISON e VICKERS, 1990), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína¹¹ (CFDA) e Iodeto de Propídio¹² (IP). A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozóides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (corados em verde em toda sua extensão) e lesados (corados em vermelho).

Integridade de membrana espermática através do choque hiposmótico

A integridade funcional da membrana espermática foi testada também através do teste do choque hiposmótico (CHIPO) (VASQUEZ *et al.*, 1997). A avaliação foi feita utilizando-se câmara de Neubauer e microscopia óptica com contraste de fases, em aumento de 400x, procedendo-se à contagem de 100 células, registrando o número de células que apresentavam cauda do espermatozóide normal a àquelas que estavam dobrada ou enrolada. O valor que foi utilizado para análise do CHIPO, correspondeu à diferença obtida entre o número de espermatozóides com cauda dobrada e enrolada, observadas no teste realizado com a solução hiposmótica (0 mOsm/kg) e isosmótica (312 mOsm/kg).

Avaliação *in vivo*

Para avaliação da capacidade fertilizante *in vivo* do sêmen congelado em glicerol e dimetilacetamida, 60 leitoas pré-púberes (30 para cada grupo) com peso médio de 86,5 kg e idade de 155 d foram tratadas com 1000 UI de eCG¹³ (sendo considerado hora 0) e 70-72 h após com de 500 UI de hCG¹⁴ (CORRÊA *et al.*, 2006). Ambos os hormônios foram administrados por via intramuscular. Entre 31-34 h após a aplicação do hCG as leitoas foram inseminadas ao acaso, independente dos sinais de cio e abatidas entre 36 a 40 h após a IA (BORDIGNON *et al.*, 1996).

Para elaboração das doses inseminantes, foi feito o descongelamento das palhetas do tratamento correspondente (glicerol ou DMA) em banho-maria a 37 °C por 20 s imediatamente antes de cada IA. Após o descongelamento, o conteúdo das palhetas foi posto em uma dose de 60 ml de BTS em temperatura de 37 °C

¹¹ C 5041 - Sigma

¹² P 4170 - Sigma

¹³ NOVORMON® - DASPET

¹⁴ CHORAGON® - Droga Rápida

(BORDIGNON *et al.*, 1996), a fim de atingir uma concentração de 1×10^9 SPTZ vivos (baseados na análise prévia da motilidade espermática).

O método de IA utilizado foi o pós-cervical utilizando-se a pipeta *DeepGoldingPig*¹⁵, que é fixada na cérvix e possui um cateter com um prolongamento de 20 cm, que permite a deposição do sêmen no corpo do útero (WATSON e BEHAN, 2002; SERRET *et al.*, 2005).

No frigorífico as genitálias das fêmeas foram coletadas e transportadas para o laboratório, onde se determinou a taxa de ovulação para cada fêmea, a partir da contagem do número de corpos hemorrágicos em cada ovário. Para a colheita das estruturas (oócitos e embriões), cada oviduto (direito e esquerdo) foi lavado com 20 ml de PBS (solução de tampão fosfato) no sentido útero-ovário, sendo que o conteúdo lavado dentro de uma placa de petri e realizada a procura em lupa.

Para cada fêmea foram determinadas as taxas de recuperação (TR) e fertilização (TF), a partir das seguintes fórmulas:

- Taxa de recuperação (TR%)

$$TR = (\text{n}^\circ \text{oócitos e/ou embriões recuperados} / \text{n}^\circ \text{corpos hemorrágicos contados}) \times 100$$

- Taxa de fertilização (TF%)

$$TF = (\text{n}^\circ \text{de embriões} / \text{n}^\circ \text{de estruturas recuperadas}) \times 100$$

Análise estatística

Estatísticas descritivas foram calculadas para as avaliações espermáticas *in vitro*, manifestação de cio, número de corpos hemorrágicos, oócitos, embriões, taxa de recuperação e fertilização.

A análise de concepção entre os grupos glicerol e DMA foi avaliada pelo qui-quadrado. As variáveis dependentes consideradas na análise de variância foram: número de corpos hemorrágicos; oócitos; embriões; taxas de recuperação e fertilização. A variável independente considerada foi o crioprotetor utilizado (glicerol ou DMA). A comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey. Todas as análises foram através do Statistix® (2004).

¹⁵ IMV

Resultados e Discussão

Os resultados de avaliação *in vitro* do sêmen após a coleta e após o descongelamento estão apresentados na Tabela 2. A sensibilidade do espermatozóide suíno ao processo de congelamento-descongelamento é evidenciada na comparação dos resultados das avaliações do sêmen após a coleta, com os resultados obtidos após o congelamento. A comparação entre os crioprotetores glicerol e DMA nas avaliações após o descongelamento, evidencia-se a superioridade dos resultados de motilidade e integridade de membrana por fluorescência obtidos no tratamento com DMA. Para a elaboração das doses inseminantes foi utilizado o resultado de motilidade obtido após o descongelamento (Tabela 2), calculando-se dessa forma a quantidade de palhetas utilizadas a fim de atingir 1×10^9 SPTZ viáveis por dose.

Tabela 2. Parâmetros de avaliação do sêmen após a coleta e após o congelamento.

| Parâmetro avaliado | Momento da avaliação | | |
|--|----------------------|------------------|------|
| | Pós-coleta | Pós-descongelado | |
| | | Glicerol | DMA |
| Motilidade, % | 85,0 | 53,0 | 65,0 |
| Integridade de membrana por fluorescência, % | 77,0 | 45,0 | 53,0 |
| Integridade de membrana pelo CHIPO*, % | 35,0 | 26,0 | 28,0 |

*CHIPO: Choque hipoosmótico

Em todas as fêmeas utilizadas no trabalho foram encontrados nos ovários folículos pré-ovulatórios e/ou corpos hemorrágicos, demonstrando que todas responderam ao protocolo hormonal utilizado. O número de corpos hemorrágicos, taxa de recuperação e os resultados de concepção e fertilização para cada grupo, estão apresentados na Tabela 3. A média de corpos hemorrágicos foi superior àquelas obtidas por Corrêa *et al.* (2006), porém, inferiores as de Bordignon *et al.* (1996), enquanto que as taxas de recuperação obtidas se assemelham aos dados desses autores. Este trabalho foi realizado com o uso de leitoas pré-púberes, que embora tenham respondido ao protocolo hormonal, a taxa de ovulação é baixa quando comparado ao uso de fêmeas múltiparas (ROCA *et al.*, 2003).

Tabela 3. Taxa de recuperação de estruturas e efeito do tratamento sobre a fertilidade.

| Parâmetro | Tratamento | |
|-------------------------|-------------|--------|
| | Glicerol 3% | DMA 5% |
| Leitoas inseminadas | 30 | 30 |
| Corpos hemorrágicos | 306 | 299 |
| Taxa de recuperação, % | 68,9 | 66,9 |
| Taxa de concepção, % | 73,3 | 76,6 |
| Taxa de fertilização, % | 48,6 | 59,4 |

Os dados não diferem ($P > 0,05$).

Usando sêmen congelado, Bordignon *et al.* (1996) conseguiram 85% de taxa de concepção trabalhando com leitoas pré-púberes sincronizadas, no entanto utilizando IA intracervical com doses de 6×10^9 SPTZ. Roca *et al.* (2003) obtiveram em torno de 79% de taxa de prenhez aos 28 d, com o emprego de sêmen congelado através do método de IA intra-uterina profunda com dose de 1×10^9 SPTZ e na IA intracervical com doses com 6×10^9 SPTZ, porém utilizando fêmeas múltiparas. Eriksson *et al.* (2002) utilizando IA intracervical com sêmen congelado em fêmeas múltiparas, alcançaram 72% de taxa de parto, usando protocolo com duas inseminações por estro, com concentração de 5×10^9 SPTZ por dose. Taxa de prenhez de 40% aos 28 é citada com o uso de IA intra-uterina profunda utilizando dose de 1×10^9 de SPTZ (WONGTAWAN *et al.*, 2006).

Não houve diferença entre os grupos glicerol e DMA na taxa de concepção ($P > 0,05$), e os resultados se assemelharam aos relatados com o uso de sêmen congelado. A taxa de fertilização do grupo glicerol é comparável à obtida por Bordignon *et al.* (1996), porém a fertilização do grupo DMA é superior aos resultados desses autores. Porém, os resultados neste estudo são oriundos de IA pós-cervical com doses de 1×10^9 de SPTZ, ao contrário das doses de $5-6 \times 10^9$ de SPTZ, embora utilizando IA intracervical. Além disso, destacam-se os resultados obtidos através do uso de DMA, pois, a maioria dos trabalhos utilizando sêmen suínos congelado, baseiam-se no uso de glicerol.

Não foi encontrada diferença ($P > 0,05$) na taxa de fertilização entre os grupos glicerol e DMA. No entanto o grupo DMA é superior 10% em relação ao glicerol, além do que possui uma tendência de maior taxa de concepção.

Além disso, há que se destacar os resultados da avaliação espermática pós-descongelamento. Baseado nas avaliações de motilidade a fim de elaborar as doses inseminantes, foram necessárias 10 palhetas do tratamento DMA, enquanto que para atingir a mesma concentração foram utilizadas 13 palhetas de glicerol. Essa diferença de 30% torna o processo com o uso de DMA mais eficiente, resultando em um melhor aproveitamento do ejaculado.

Devido ao fato do uso de IA com sêmen congelado, especial atenção deve ser dada ao momento da IA, pois, há um menor período necessário para a capacitação dos espermatozoides, além do menor tempo de permanência destes no oviduto (JOHNSON, 1985; ROCA *et al.*, 2003). Com o protocolo hormonal utilizado, a estimativa é de que os animais ovularam 42 ± 2 h após a aplicação do hCG (SRIKANDAKUMAR e DOWNEY, 1989; HUHNS *et al.*, 1996). A taxa de fertilização com sêmen descongelado pode diminuir quando as fêmeas são inseminadas mais do que 4 horas antes ou após a ovulação (WABERSKI *et al.*, 1994). No entanto, não foi feito o acompanhamento da dinâmica folicular. Dessa forma, o momento da IA pode ter influenciado especialmente a taxa de fertilização, e melhores resultados poderão ser obtidos com a IA realizada o mais próximo possível do momento da ovulação, acompanhado através de ultra-sonografia.

Conclusões

Os resultados obtidos na fertilização *in vivo* com sêmen suíno congelado com DMA permitem considerá-la como um substituto ao glicerol nos protocolos de congelamento.

Referências

- ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, S.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION*, 14, Stockholm, 2000. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.157.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. *In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Applied Animal Reproduction*. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997a. Cap. 14, p.147-157.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. *In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Applied Animal Reproduction*. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997b. Cap. 15, p.159-170.
- BENNEMANN, P.E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G.N.; WEBER, D.; SCHMIDT, A.C.T.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination at different pre-ovulatory intervals. **Animal Reproduction**, 1, 106-110, 2004.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Uso de diferentes crioprotetores no congelamento de sêmen suíno. *In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA*, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006a, CD-ROM.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORRÊA, E.K.; PERONDI, A.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Congelamento de sêmen suíno usando amidas em diferentes concentrações. *In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA*, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006b, CD-ROM.
- BORDIGNON, V.; DESCHAMPS, J.C.; SECHIN, A.; PALUDO, G.; VIVIAN, J.C.; NICOLA, E.; BOZZATO, J.S.; GONSALES, J. A.; PIMENTEL, C.A. Effect of trehalose on motility, acrosome and fertility of the frozen-thawed boar semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 20, 54-62, 1996.
- CORRÊA, M.N.; LUCIA, T.Jr.; BIANCHI, I.; SCHMITT, E.; BORDIGNON, J.; RECH, D.C.; PERUZZO, I.A.; DESCHAMPS, J.C. Swine semen cooled at 5 °C with PIGPEL-5 extender: effects on parameters of semen quality in vitro and fertility estimators in vivo. **Animal Reproduction**, 3, 41-48, 2006.

- CRABO, B.G. Preservation of boar semen: A worldwide perspective. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION*, 2, 1990, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville: 1990, p.3-9.
- ERIKSSON, B.M.; PETERSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flat-pack container. **Theriogenology**, 58, 1065-1079, 2002.
- GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION*. 14, 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.307.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproductive and Fertility**. 88, p.343-352, 1990.
- HUHN, P.E.; JÖCHLE, W.; BRÜSSOW, K.P. Techniques developed for the control of estrus ovulation and parturition in the east german pig industry: A review. **Theriogenology**. 46, 911-924, 1996
- JOHNSON, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION*, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1985, p.199-222.
- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION*, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.121-128.
- LUKASZEWICZ, E.; CHRZANOWSKA, M.; JERYSZ, A.; CHELMONSKA, B. Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. **Animal Reproduction Science**. 80, 163-173, 2004.
- MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; PARRILLA, I.; CUELLO, C.; GIL, M.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA J.; VAZQUEZ, J.L. Incidence of unilateral Fertilizations after low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. **Reproductive in Domestic Animals**. 41, 41-47, 2006.
- MEDEIROS, A.S.L; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, 58, 273-276, 2002.

- OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, 39, 177-184, 1999.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**. 60, 677-689, 2003.
- POLGE, C.; SALOMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. **Veterinary Record**. 87, 424-429, 1970.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, 164-166, 1949.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, H.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, 84, 2692-2699, 2006.
- ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, 60, 77-87, 2003.
- SERRET, C.G.; ALVARENGA, M.V.F.; CÓRIA, A.L.P.; DIAS, C.P.; CORCINI, C.D.; CORRÊA, M.N.; DESCHAMPS, J.C.; BIANCHI, I.; LUCIA, T.Jr. Intrauterine artificial insemination in female swine with distinct sperm concentrations, parities and methods of ovulation estimation. **Animal Reproduction**, 2, 250-256, 2005.
- SRIKANDAKUMAR, A.; DOWNEY, B.R. Induction of ovulation in gilts with cloprostenol. **Theriogenology**, 32, 445-449, 1989.
- STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.
- VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, 47, 913-922, 1997.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, 58, 249-251, 2002.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, 42, 831-840, 1994.

WONGTAWAN, T.; SARAIVIA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses **Theriogenology**, 65, 773–787, 2006.

WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially-based field trial. **Theriogenology**, 57, 1683-1693, 2002.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr**, 82, 261-267, 1975.

7. ARTIGO V: Identificação de um fator de 26 kDa no plasma seminal associado a integridade de membrana de espermatozóides suínos pós-descongelamento

**Submetido: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*
(Formatado segundo as normas da revista)**

***I. Bianchi; T. Collares; V.F. Campos; P.V. Cavalcanti; C. Kaefer; Corrêa, E.K.;
O.A. Dellagostin; T. Lucia Jr.; J.C. Deschamps; M.N. Corrêa***

Resumo

A compreensão de mecanismos moleculares envolvidos nos processos de maturação de espermatozoides e associação com componentes do plasma seminal, tem fornecido informações para a determinação de marcadores bioquímicos associados com a qualidade do sêmen. A aplicação de marcadores bioquímicos para identificar propriedades biológicas do sêmen pode providenciar informações específicas sobre a funcionalidade espermática durante o congelamento do sêmen. O presente estudo teve por objetivo identificar polipeptídeos associados à integridade de membrana plasmática (IMP) de espermatozoides suínos após o processo de congelamento/descongelamento. O perfil protéico do plasma seminal em SDS-PAGE demonstrou a presença de 09 bandas polipeptídicas com pesos moleculares variando de 11 a 122 kDa. Dentre essas, uma banda de 26 kDa demonstrou associação com a IMP. A presença desta banda foi associada com a baixa IMP (< 55%). Em contraste, não foi observada a associação das outras bandas detectadas com a IMP. Estes dados sugerem que proteínas presentes no plasma seminal suíno interagem com a superfície da membrana plasmática do espermatozóide, indicando a necessidade de novos estudos para elucidar o processo fisiológico dessas associações.

Palavras-chave: Proteínas seminais, Criopreservação, Sêmen, Marcador bioquímico.

Abstract

The knowledge about the molecular mechanisms involved in the sperm maturation process and their associations with seminal plasma components has helped to detect biochemical markers of semen quality. The application of those markers to identify biological properties of the semen may generate specific information about the sperm function during cryopreservation. The aim this study was to identify polypeptides in boar seminal plasma that could be associated to plasma membrane integrity (IMP) of thawed spermatozoa. The SDS-PAGE profile of boar seminal plasma demonstrated the presence of 9 bands with molecular ranging from 11 to 122 kDa. One of those bands (26 kDa) was associated with IMP. The presence of this band was associated with reduced IMP (< 55%). Our data indicate that seminal plasma proteins interact with the plasma membrane of boar spermatozoa, which opens promising possibilities for further studies to investigate these associations.

Keywords: Seminal proteins, Cryopreservation, Semen, Biochemistry marker.

Introdução

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fertilização (Kraus *et al.*, 2005). O plasma seminal contém diferentes componentes, entre estes, proteínas, as quais são os maiores constituintes orgânicos do fluido seminal, apresentando fundamental importância fisiológica ao sêmen, estando presente na forma de distintos complexos associados. A composição, a conformação e o tamanho destas proteínas são específicos para cada espécie, as quais são estáveis também sob determinadas condições (Jelínková *et al.*, 2003).

O evento da fertilização nos mamíferos inclui interações bioquimicamente reguladas, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozóides durante a ejaculação, interação de proteínas de membrana dos espermatozóides com células epiteliais do oviduto, capacitação espermática, reconhecimento dos gametas, ligação entre os gametas, reação acrossômica, penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão dos gametas (Jansen *et al.*, 2001; Suarez *et al.*, 2001; Strzezek *et al.*, 2005). A membrana plasmática do espermatozóide sofre extensivas remodelações quando o espermatozóide interage com proteínas do plasma seminal durante a ejaculação. Neste sentido, dois tipos de interações protéicas podem estar envolvidos nesse processo: a interação de proteínas com a membrana espermática e interações mútuas entre proteínas de formas monoméricas (Manásková *et al.*, 2003).

Outras funções e características dos espermatozóides que podem ser influenciadas por proteínas do plasma seminal, incluem a capacitação e reação acrossômica (Manjunath; Thérien, 2002), bem como a motilidade espermática (Curi *et al.*, 2003), e a integridade genômica (Chen *et al.*, 2002). Desta forma, com a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies, alguns desses polipeptídeos vêm sendo utilizados como marcadores seletivos de fertilidade e de congelabilidade do sêmen (Killian *et al.*, 1993; Roncoletta *et al.*, 1999; Jobim *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2006). Um estudo de Nauc e Manjunath (2000) demonstrou que proteínas do plasma seminal bovino (BSP) possuem a propriedade de ligação à superfície do espermatozóide, diminuindo sua quantidade após a criopreservação do sêmen, sugerindo alguma relação com a congelabilidade do sêmen. Entretanto, ainda é desconhecida a influência destas proteínas sobre o processo de criopreservação do sêmen. Roncoletta *et al.* (1999) demonstraram que

a presença de um fator polipeptídico de 61 kDa no plasma seminal está associado com a alta congelabilidade do sêmen de touros da raça Gir. Contudo, não foram encontrados dados relacionando proteínas do plasma seminal com a integridade da membrana plasmática de sêmen suíno criopreservado.

Este trabalho teve por objetivo identificar polipeptídeos provavelmente associados à integridade de membrana plasmática de sêmen suíno submetido ao congelamento e descongelamento.

Material e Método

Animais

Foram utilizados três machos suínos adultos mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo. Para a coleta, processamento e criopreservação do sêmen foram realizadas seis coletas de cada macho. As coletas foram realizadas através do método da mão-enluvada (Bearden; Fuquay, 1997), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel. Somente a porção do ejaculado com maior concentração espermática foi utilizada para o processo de congelamento (Westendorf *et al.*, 1975; Bordignon *et al.*, 1996).

Criopreservação, envase e descongelamento

Imediatamente após a coleta do sêmen, para cada macho foi obtida da fração rica em espermatozóides uma alíquota de 20 ml em tubo cônico de 50 ml, e diluída (1:1, v/v) no diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (Levis, 2000). Após a diluição inicial foi feito o resfriamento por 60 min a 24 °C, e seguiu-se o resfriamento por mais 60 min até 15 °C, quando então foi feita a centrifugação a 800 x *g* por 10 min (SORVALL[®]RC6). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozóides foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo) para uma concentração de 450 x 10⁶ espermatozóides/ml. O resfriamento foi realizado durante 90 min até 5 °C. No processo de congelamento foi utilizada a N,N-Dimetilacetamida (DMA) (C₄H₉NO) com peso molecular de 87,12 como crioprotetor intracelular. O diluidor de congelamento a ser adicionado a 5 °C foi elaborado a partir do diluidor de resfriamento, acrescido de 1,5% do detergente *Orvus Ex Paste*, e o respectivo crioprotetor para concentração final de 5%, v/v, (DMA 5%). O envase das doses de sêmen foi feito em palhetas de 0,5 ml, com 150 x 10⁶ espermatozóides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm

acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após armazenadas em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o descongelamento. As palhetas foram descongeladas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s, sendo re-suspensas em tubo cônico contendo 10 ml de BTS previamente aquecido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1:20, v/v).

Caracterização das proteínas do plasma seminal (SDS-PAGE)

Uma alíquota de sêmen após a coleta foi centrifugada ($2000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) logo após a coleta. O plasma seminal foi congelado e mantido em nitrogênio líquido. Para a análise as amostras foram descongeladas e recentrifugadas ($3000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), para eliminar possível contaminação com espermatozoides. O plasma seminal foi diluído três vezes em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Cada amostra foi preparada para a corrida com 50 μl de plasma seminal e 25 μl de tampão de amostra (Glicerol; Tris-HCl 0,6173M - pH 6,8; B-mercaptoetanol; SDS 10%; azul-de-bromofenol; H_2O), após foram submetidas à fervura por 10 min para desnaturação protéica.

A eletroforese unidimensional SDS-PAGE (Laemmili, 1970) foi realizada com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell® (Bio-Rad Laboratories, USA). Foram usados géis concentrados a 15%. As amostras foram concentradas a 50 V por 20 min, e a corrida a 100 V por aproximadamente 2 h. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™ (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Os géis foram corados a temperatura ambiente com Coomassie Brilliant Blue em *over-night*. Os géis foram analisados com o software TotalLab TL 100 v. 2006 (Nonlinear Dynamics, UK).

Avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP) de espermatozoides (SPTZ)

Após o descongelamento foi feita à avaliação da IMP espermática por fluorescência (Harrison; Vickers, 1990), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP). Após incubação em temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min foi feita a avaliação em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozoides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (corados em verde em toda sua extensão) ou lesados (corados em vermelho).

Após o descongelamento das palhetas foi feita a distribuição de frequências dos resultados de IMP dos espermatozoides e feita à categorização em menor de

55% e igual ou maior que 55%. Com isso foi relacionado à integridade no descongelamento com a presença ou ausência de cada banda protéica no plasma seminal.

Resultados e Discussão

No total, foram detectadas nove bandas protéicas no perfil eletroforético do plasma seminal dos machos analisados (Tab. 1). O peso molecular das bandas variou de 11 a 122 kDa. Foram observadas diferenças individuais no padrão do perfil eletroforético entre as amostras analisadas. Muitas proteínas com peso molecular semelhante ao das bandas detectadas neste experimento foram identificadas nos bancos de dados *in silico*. Uma banda de 26 kDa (Fig. 1) apresentou uma associação com a IMP. Foi observado que, em 88% das amostras que apresentavam $IMP \geq 55\%$, a banda de 26 kDa estava ausente (Tab. 2). Por outro lado, não foi observada a associação de outras bandas detectadas com a integridade de membrana. O plasma seminal contém fatores protéicos específicos que provocam importantes efeitos tanto na capacidade de fertilização do espermatozóide quanto na fisiologia reprodutiva da fêmea (Strzezek *et al.*, 2005). Entretanto, os efeitos biológicos específicos das proteínas do plasma seminal nas funções espermáticas são complexos e não compreendidos totalmente. Nos bancos de dados *in silico* foi encontrado um grupo protéico com peso molecular de aproximadamente 26 kDa chamado *Sialoproteínas*, que tem por função a inibição da aglutinação das cabeças dos espermatozoides. A deficiência deste grupo pode comprometer o potencial espermático de fertilização (Strzezek *et al.*, 2002). Usando eletroforese bidimensional (2D-PAGE), Flowers (2001) demonstrou a importância biológica de duas proteínas (26 kDa, pl 6,2; 55 kDa, pl 4,8) presentes no plasma seminal de suínos, relacionadas com altas taxas de parição (em torno de 86%). Killian *et al.* (1993) associaram quatro proteínas do plasma seminal com a fertilidade de touros. Duas proteínas (26 kDa, pl 6,2; 55 kDa, pl 4,5) foram detectadas em touros de alta fertilidade e outras duas (16 kDa, pl 4,1; 16 kDa, pl 6,7) estavam presentes em touros de baixa fertilidade.

A maioria das características da superfície dos espermatozoides é adquirida no epidídimo (processo de maturação) e na ejaculação pela adsorção de componentes específicos do plasma seminal (Amann *et al.*, 1993). É geralmente aceito que a ligação de algumas proteínas do plasma seminal estabiliza

componentes da membrana plasmática, mascara antígenos expostos na superfície celular e previne contra a reação acrossômica prematura (Strzezek *et al.*, 2005). É bem conhecido que a adsorção de elementos pela superfície celular é um processo dependente da temperatura. No caso de células espermáticas a adsorção pode ser afetada por temperaturas de congelamento, dessa forma a adsorção de proteínas no sêmen congelado pode ser diferente daquele mantido à temperatura ambiente (De Leeuw *et al.*, 1990). No presente estudo, os espermatozoides foram separados do plasma seminal e congelados, o que não impede a possível influência deste fluido sobre as células espermáticas durante o período de processamento.

Em estudos realizados com suínos miniatura observou-se que o plasma seminal contém fatores que modificam a célula espermática antes do congelamento e reduzem a capacidade de penetração no oócito após o congelamento (Kawano *et al.*, 2004). Evidências têm demonstrando o papel de proteínas do plasma seminal na tecnologia de preservação do sêmen suíno (Centurion *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004a; Caballero *et al.*, 2004b; Ceremades *et al.*, 2004). A suplementação de diluentes de sêmen com espermadesinas PSP-I/PSP-II purificadas tem um efeito benéfico na viabilidade de espermatozoides preservados (Centurion *et al.*, 2003). Entretanto, outros estudos demonstraram que a suplementação de diluentes de congelamento com essas espermadesinas PSP-I/PSP-II não influenciou a sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelamento, mas teve um efeito inibitório na capacidade de fertilização desses espermatozoides descongelados (Caballero *et al.*, 2004a; Ceremades *et al.*, 2004). Apesar disso, o papel biológico dessas espermadesinas na fisiologia espermática ainda não é bem conhecido. Por outro lado, efeitos benéficos das proteínas do plasma seminal são relatados em alguns trabalhos (Castellini *et al.*, 2000, Garner *et al.*, 2001). Jobim *et al.* (2004) demonstraram que há diferenças nas proteínas do plasma seminal de touros com boa e má resposta ao congelamento, sugerindo o estudo dessas proteínas do plasma como marcadores de congelabilidade. O uso de marcadores bioquímicos para a identificação de propriedades biológicas do sêmen poderá ajudar a desenvolver novos critérios que são precisos e objetivos na predição e melhoramento da fertilidade de machos (Fraser *et al.*, 2006).

Conclusão

Neste estudo é demonstrada a associação de um fator polipeptídico que possui 26 kDa, com a baixa integridade de membrana plasmática do espermatozóide suíno após o congelamento/descongelamento. Além disso, essa banda polipeptídica pode representar até mais de uma proteína com várias diferenças entre elas. Trabalhos futuros de proteômica devem ser realizados a fim de caracterizar esta banda protéica. A compreensão e o controle de mecanismos envolvidos na fertilidade, são de fundamental importância para o máximo desempenho da reprodução animal artificial.

Referências

- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. The epididymis and sperm maturation - a perspective. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.5, p.361-381, 1993.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection, in: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Eds.), *Applied Animal Reproduction*. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, p.147-157.
- BORDIGNON, V.; DESCHAMPS, J.C.; SECHIN, A. et al. Effect of trehalose on motility, acrosome and fertility of the frozen-thawed boar semen. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.20, p.54-62, 1996.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; CENTURION, F. et al. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod. Domestic. Anim.*, v.39, p.370-375, 2004a.
- CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GIL, M.A. et al. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J. Androl.*, v. 25 p. 1004-1015, 2004b.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; MARONI, M. et al. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.*, v. 63, p.275-282, 2000.
- CENTURION, F.; VAZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J. et al. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. Reprod.*, v.69, p.640-646, 2003.
- CEREMADES, T.; CARAVAJA, G.; HERNANDEZ, M. et al. Freezing of boar semen is not affected by the addition of seminal plasma spermadhesins. *Reprod. Domestic. Anim.*, v.39, p.269, 2004.
- CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H. et al. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction*, v.124, p.491-499, 2002.
- CURI, S.M.; ARIAGNO, J.I.; CHENLO, P.H. et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch. Androl.*, v.49, p.343-349, 2003.
- DE LEEUW F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.
- FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. *Swine News*, USA, 2001, p.1-4.

- FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A. et al. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. *Reprod. Biol.*, v.6, p.5-20, 2006.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, v.56, p.31-40, 2001.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.*, v.88, p.343-352, 1990.
- JANSEN, S.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, v.168 p.82-92, 2001.
- JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.32, p.99-107, 2003.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.253-266, 2004.
- KAWANO, N.; SHIMADA, M.; TERRADA T. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing, *Theriogenology*, v.61, p.351-364, 2004.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J. Reprod. Immunol.*, v.65, p.33-46, 2005.
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v.5, p.677-680, 1970.
- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. *Proceedings...* Beltsville, 2000, p.121-128.
- MANÁSKOVÁ, P.; BALINOVA, P.; KRAUS, M. et al. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. *A. J. Reprod. Immunol.*, v.50, p.399-410, 2003.

- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, v.53, p.109-119, 2002.
- MOURA, A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, in press, 2006.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* v.63, p.1058-1066, 2000.
- RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.H. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. *Brazil. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, 1999.
- STRZEZEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P. et al. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, v.20, p.255-266, 2002.
- STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W. et al. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod. Biol.*, v.5, p.279-290, 2005.
- SUAREZ, S.S. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs*, v.168, p.105-112, 2001.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, v.82, p.261-267, 1975.

Tabela 1. Distribuição de bandas protéicas detectadas no plasma seminal suíno, através de SDS-PAGE, com a média de peso molecular e o desvio padrão em kDa.

| Bandas Protéicas | Peso Molecular (kDa) | |
|------------------|----------------------|-----|
| | Média | DP |
| 1 | 122 | 2,5 |
| 2 | 96 | 2,3 |
| 3 | 85 | 2,9 |
| 4 | 63 | 1,2 |
| 5 | 43 | 2,0 |
| 6 | 26 | 0,6 |
| 7 | 17 | 0,6 |
| 8 | 14 | 0,2 |
| 9 | 11 | 0,1 |

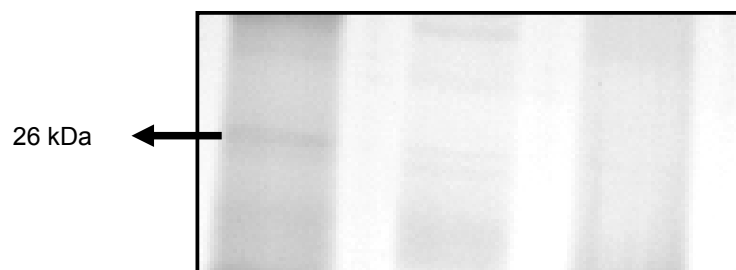


Figura 1. Banda de 26 kDa do plasma seminal suíno

Tabela 2: Presença (Sim) e Ausência (Não) de proteínas no plasma seminal relacionado com IMP >55% descongelado

| Macho | Perfil | Banda, kDa, n (%) | | | | | | | | |
|--------------|------------|-------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | 122 | 96 | 85 | 63 | 43 | 26 | 17 | 14 | 11 |
| 1 | Sim | 5 (83) | 6(100) | 6 (100) | 6 (100) | 6(100) | 2 (33) | 3 (50) | 6 (100) | 6 (100) |
| 1 | Não | 1 (17) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 4 (67) | 3 (50) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| 2 | Sim | 3 (60) | 3 (60) | 5 (100) | 5 (100) | 2 (40) | 0 (0.0) | 3 (60) | 5 (100) | 5 (100) |
| 2 | Não | 2 (40) | 2 (40) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (60) | 5(100) | 2 (40) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| 11 | Sim | 3 (60) | 3 (60) | 5 (100) | 5 (100) | 3 (60) | 0(100) | 4 (80) | 5 (100) | 5 (100) |
| 11 | Não | 2 (40) | 2 (40) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 2 (40) | 5(100) | 2 (40) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Total | Sim | 11(69) | 12(75) | 16 (100) | 16(100) | 11(69) | 2 (12) | 10 (62) | 16 (100) | 16 (100) |
| Total | Não | 5 (31) | 4 (25) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 5 (31) | 14(88) | 6 (38) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |

8. CONCLUSÕES GERAIS

Foi estabelecido um novo protocolo para o processo de congelamento do sêmen suíno, alterando o período de resfriamento até 15 °C para 120 min e uso de dimetilacetamida na concentração de 5% como crioprotetor intracelular.

Foi identificado que a ausência de um fator de 26 kDa no plasma seminal suíno, esteve associado a melhora na integridade de membrana plasmática de espermatozóides após o descongelamento.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A viabilização da utilização do congelamento de sêmen na espécie suína parece estar na dependência, não só de um melhor conhecimento estrutural da célula espermática, mas também do esclarecimento do efeito das substâncias utilizadas durante o processo de congelamento e descongelamento, além das interações entre os componentes da célula espermática e o plasma seminal.

O presente trabalho apresenta a melhora nos resultados de avaliações *in vitro* após o descongelamento, através do uso de crioprotetores a base de amidas em relação ao uso convencional de glicerol e de alterações no protocolo de congelamento. Além disso, demonstra possíveis relações de proteínas presentes no plasma seminal com os resultados de integridade de membrana após o descongelamento.

As avaliações *in vitro* do sêmen utilizadas neste trabalho foram: motilidade óptica, vigor espermático, morfologia, concentração, osmolalidade, pH, integridade de membrana através de sondas fluorescentes (iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína) e integridade de membrana espermática pelo choque hiposmótico.

Para melhor avaliação do sêmen há necessidade de intensificar o uso de outros métodos de avaliação. Isso permitirá acumular um conjunto de informações, a fim de elucidar a relação dos resultados de avaliações *in vitro* com àqueles obtidos com o descongelamento, bem como, com os resultados *in vivo*, que ainda não estão completamente compreendidas. Algumas alternativas de análise são:

- Uso de conjunto de sondas fluorescentes para avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial e compactação da cromatina;
- Métodos de avaliação espermática computadorizados (CASA);
- Integridade de DNA (teste cometa);
- Fertilização *in vitro* (FIV);
- Teste de penetração espermática;
- Citometria de fluxo;
- Análise da ultra-estrutura celular através do uso da microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

O método de biologia molecular utilizado neste estudo foi a eletroforese unidimensional, que indicou a possibilidade de relações de proteínas do plasma seminal com a integridade espermática. Este efeito deve ser melhor investigado, incrementando o uso da eletroforese bi-dimensional, a fim de propiciar o estudo mais específico dessas proteínas, o que poderá vir a confirmar possíveis marcadores de congelabilidade e verificar o efeito individual e genético nos resultados obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho com o uso alternativo de crioprotetores intra e extracelulares, sugerem que um estudo mais aprofundado do uso combinado de amidas e destas com glicerol e também, de outros possíveis crioprotetores e/ou aditivos podem trazer resultados ainda melhores. Substâncias como os lipossomos (microvesículas de lipídios obtidas por sonicação), biopolímeros tais como a xantana e os bloqueadores da formação de gelo poderão ser avaliados como crioprotetores/aditivos e mensurada sua influência na dinâmica da membrana plasmática e, portanto, aumentando a resistência celular às injúrias do congelamento.

Trabalhos mais simples, que poderão trazer informações importantes, como investigar o uso de palheta de diferentes volumes, ou mesmo o uso de diferentes concentrações espermáticas serão importantes para adicionar conhecimento sobre o congelamento de sêmen.

Neste trabalho o congelamento de sêmen foi realizado de forma manual. Os resultados de congelamento poderão ser otimizados com o uso de equipamentos

automatizados de congelamento e descongelamento, que reduzirá o viés de execução da técnica.

O processamento de sêmen congelado, em escala comercial, necessitará de investimento em equipamentos, alguns deles muito caros, necessários ao processo de congelamento e descongelamento. A centrifugação do sêmen é passo fundamental da técnica, a fim de eliminar o excesso de plasma seminal e concentrar o ejaculado. Esta etapa foi realizada de duas formas neste trabalho. A primeira com centrífuga refrigerada a temperatura de 15 °C, com sucesso. A segunda realizada na temperatura de 24 °C com centrífuga convencional, sem êxito. No entanto, podem-se investigar alternativas de protocolos a fim de evitar o uso de centrifugação refrigerada a 15 °C, que muito colaborará para o processo de congelamento em escala comercial, simplificando o processo.

Os resultados de fertilidade obtidos são satisfatórios, especialmente considerando o fato da concentração espermática utilizada, em função do uso do método de inseminação artificial pós-cervical. Assim, o uso de doses mais concentradas com este método de inseminação poderá trazer ainda melhores resultados. Outro estudo fundamental será o uso de sêmen congelado através da inseminação intra-uterina profunda.

Os resultados *in vivo* foram obtidos através da sincronização de leitoas pré-púberes. Deve-se investigar também o uso desta metodologia através de inseminações de fêmeas múltiplas, especialmente com ovulações espontâneas.

Os dados de fertilização através da avaliação de clivagem permitiram inferir sobre o uso de crioprotetores alternativos ao uso de glicerol. Porém há necessidade de se avaliar o desenvolvimento embrionário. Isto responderá a indagação de que com o uso de sêmen congelado, se houver a clivagem, o desenvolvimento embrionário ocorrerá normalmente, ou se, o processo de congelamento poderá comprometer o DNA celular, ainda assim permitindo a clivagem, porém inibindo o desenvolvimento embrionário.

Para que esses trabalhos possam ser realizados são fundamentais a participação e visão multidisciplinar, dado os desafios que o processo de congelamento impõem. Dessa forma, parcerias interinstitucionais, de grupos de pesquisa das áreas afins e destas com a iniciativa privada são imprescindíveis e devem ser buscadas.

10. REFERÊNCIAS

- ALMILID, T.; JOHNSON, L.A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Animal Science**, 66, 2899-2905, 1988.
- ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, 50, 535-543, 1998.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, 22, 1061-1069, 2001.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, 70, 708-717, 2004.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Present situation of artificial insemination in swine. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33, 17- 32, 2005.
- BOSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, 50, 699-706, 1998.
- BUHR, M.M.; HE, L.; KASIMANICKAM, V. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.61-69.
- BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, 31, 224-238, 1994.

- BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. In: II INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 2, 1991, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 1991, p.81-93.
- CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, L.; RANA, K.L.; HERRAEZ, M.P. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. **Cryobiology**, 37, 245-253, 1998
- CORRÊA, M.N.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; SERRET, C.G.; BORDIGNON, J.; RAMBO, G. Rate of penetration in vitro of oocytes swines using spermatozoa conditioned with extender PIGPEL-5 at 5°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 28, 161-169, 2004.
- DE LEEUW, F.E., DE LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on Bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, 30, 32-44, 1993.
- DE LEEUW, F.E., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals. Suppl. 1**, 95-104, 1991.
- DEMANIOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**, 31, 279-280. 1996.
- DESCHAMPS, J.C.; BASTOS, R.G.; NICOLA, E.S. Avanços da biotecnologia em suínos. **Ciência Animal**, 7, 79-88, 1997.
- ERIKSSON, B.; PETERSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Individual boar fertility after AI with frozen-thawed semen in relation to in vitro sperm motility and viability. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6, 2001, Missouri-Columbia. **Proceedings...** Missouri-Columbia, 2001, p.54.
- GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, 63, 283-299, 2005.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, 62, 3-22, 2000.

- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, 61, 255-266, 2004.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, 62, 143-172, 2000.
- JOHNSON, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1985, p.199-222.
- JOHNSON, L.A.; LARSSON, K. **Deep Freezing of Boar Semen**. Uppsala, Sweden, 1985, 310 p.
- KAROW, A.M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Augusta, Georgia, USA, 2001, Xytex Corporation. Disponível em: <<http://www.xytex.com/Cryobiology>>. Acesso em: 04 de agosto de 2005.
- KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-Cell™ extenders. **Theriogenology**, 52, 365-376, 1999.
- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.121-128.
- MARTIN, C.E.G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozóides eqüinos criopreservados**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- MEDEIROS, A.S.L; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, 58, 273-276, 2002a.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.I. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. **Theriogenology**, 57, 327-344, 2002b.
- MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, 57, 1695-1706, 2002.
- NARDID, O.; DYUBKO, T.; REPINA, S. A comparative study of the effect of Freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins. **Cryobiology**, 34, 107-113, 1997.

- NICOLA, E.S. **Criopreservação de embriões de suínos associando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 39 p. 1997.
- OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, 39, 177-184, 1999.
- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, 39, 1144-1149, 1974.
- PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M.; du MESNIL du BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. **Journées Rech Porcine en France**, 6, 71-76, 1974.
- PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, 29, 255-266, 1992.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, 40, 99-102, 1975.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, 34, 278-283, 1972.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, H.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, 84; 2692-2699, 2006.
- ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, 60, 77-87, 2003.
- SALAMON, S. Deep freezing of boar semen III. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa, **Australian Journal Biology Science**, 26, 239-247, 1973.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JAHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, 63, 1320-1333, 2005.

- TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, 78, 586-590, 1999.
- THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biology of Reproduction**, 66, 545-554, 2002.
- THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, 22, 382-394, 2001.
- VARELA JÚNIOR, A.S. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, 58, 249-251, 2002.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60, 481-492, 2000.
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Germany. **Proceedings...** Germany, 1996, p.135-140.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr**, 82, 261-267, 1975.
- WOWK, B.; DARWIN, M.; HARRIS, S.B.; RUSSEL, S.R.; RASH, C.M. Effects of solutes methoxilation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. **Cryobiology**, 39, 215-227, 1999.