

HUGO HIDEKI SHIOMI

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS DA
RAÇA PIAU: AVALIAÇÃO DE CURVAS DE CONGELAMENTO
E CENTRIFUGAÇÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S556c
2013

Shiomi, Hugo Hideki, 1987-

Criopreservação de espermatozóides suínos da raça Piau :
avaliação de curvas de congelamento e centrifugações / Hugo
Hideki Shiomi. – Viçosa, MG, 2013.
ix, 32f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Suíno - Reprodução. 2. Sêmen - Criopreservação.
3. Sêmen. 4. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc..
5. Biotecnologia. 6. Suíno - Recursos do germoplasma -
Criopreservação. 7. Reprodução animal. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2082

HUGO HIDEKI SHIOMI

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS DA
RAÇA PIAU: AVALIAÇÃO DE CURVAS DE CONGELAMENTO
E CENTRIFUGAÇÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2013.

Eduardo Paulino da Costa

Simone Eliza Facioni Guimarães

Rogério Oliveira Pinho

José Domingos Guimarães
(Orientador)

Aos meus pais, Massachiko Shiomi e Mari Yamaguchi Shiomi, pelo amor, dedicação e por serem exemplos para minha vida; aos meus irmãos Gustavo, Cassio e Vanessa, pela grande torcida e incentivo.

À minha batyan querida Sueko Yamaguchi (in memoriam).

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e benção.

À Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar a realização do mestrado. Aos Departamentos de Veterinária e de Zootecnia pelas instalações e recursos.

Ao meu orientador JD pelo incentivo, confiança, conhecimento e por ser exemplo de humildade.

À FAPEMIG e CNPQ pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Aos professores Paulo Sávio e Simone Guimarães pelo apoio nas pesquisas e por permitir a realização do experimento na Granja de Melhoramento de Suínos – UFV.

Ao Rogério, Daniel e Jeane pela atenção e participação ativa no experimento. A ajuda e a troca de conhecimentos foram fundamentais.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento de Suínos: Seu Zé, Aloízio, Ednaldos, Leandro, Aldair, Toninho por tornar o ambiente de trabalho um lugar ainda mais agradável.

À Diane pelo apoio incondicional em tudo, por ser uma pessoa maravilhosa e por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

Aos professores dos Departamentos de Veterinária e Zootecnia, pelo estímulo ao aprendizado e à busca pelo conhecimento.

Ao Maurício, pela amizade, pelo grande incentivo e força desde os tempos de iniciação científica.

Ao Grupo de Estudos em Reprodução Animal (GERA), pelo conhecimento.

A todos meus amigos de República: Thiago Arcebispo, Baiano, Luis Felipe, Cachinhos, Daniel Arcebispo, Allan Muller, Tales, Empadinha, Ciro e Daniel Altholf, pelos momentos de descontração e parceria.

Ao casal Renan e Glaucia Cascardo pelo carinho e amizade.

À Jeane Doucas, Tales Doucas e Carlos por me acolherem gentilmente e me tratarem tão bem quando cheguei à Viçosa. Isso é muito importante para mim e sou muito grato a vocês.

Ao Edinho, Daniel, Carol, Alberto, JC, Faider, Jhonata, Vanessa, Dani, Hugo e toda a equipe da GMS pela grande ajuda no dia-a-dia, companheirismo e amizade.

Ao professor Patarroyo e ao técnico Marcio por disponibilizarem as instalações do BIOAGRO para a realização de análises.

Aos professores participantes da Banca de Defesa do mestrado: JD, Eduardo Paulino, Simone Guimarães e Rogério Pinho. A contribuição e conhecimento de vocês são de grande valia para melhorar a dissertação.

Aos varrões da Granja, pela contribuição essencial no experimento.

A todos que direta ou indiretamente participaram dessa caminhada até o dia de hoje.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Criopreservação de sêmen.....	3
Centrifugação.....	4
Curva de congelamento.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
CAPÍTULO 1 - CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS DA RAÇA PIAU: AVALIAÇÃO DE CURVAS DE CONGELAMENTO E DE CENTRIFUGAÇÕES.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÕES.....	29
AGRADECIMENTOS.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

SHIOMI, Hugo Hideki, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Criopreservação de Espermatozoides Suínos da Raça Piau: Avaliação de Curvas de Congelamento e Centrifugações.** Orientador: José Domingos Guimarães.

A manutenção das chamadas raças naturalizadas de suínos é muito importante, pois constituem fontes potenciais de novas variantes genéticas de extrema importância para a suinocultura nacional. A raça Piau é considerada uma das melhores e mais importantes raças naturalizadas brasileiras. Desta forma, a pesquisa em desenvolvimento de protocolos de congelamento de sêmen é imprescindível para formação de bancos de germoplasma e proteção de raças suínas em risco de extinção. Protocolos de criopreservação de sêmen suíno necessitam de centrifugação para separar os espermatozoides do plasma seminal, mas essa não tem sido muito enfocada nos estudos. O objetivo no presente estudo foi avaliar o efeito do tempo de centrifugação e da curva de congelamento em protocolo de criopreservação sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*), por meio de testes de avaliação *in vitro*. Foram utilizados seis ejaculados de cinco varrões da raça Piau, com idades variando de 1,5 a 5,0 anos, aprovados por meio de exame andrológico, totalizando 30 amostras. As coletas de sêmen foram realizadas utilizando o método da estimulação com a mão enluvada com auxílio de um manequim ou uma fêmea em estro natural. Foram testadas duas centrifugações (800 G por dez minutos e 2400 G por três minutos) e duas curvas de congelamento (convencional com vapor de nitrogênio - congelamento 1 e controlada por uma máquina de congelamento programada- congelamento 2). Dessa forma os tratamentos foram divididos em M3-Centrifugação à 2400 G por 3 minutos e congelamento 2; M10- Centrifugação à 800 G por 10 minutos e congelamento 2; R3-Centrifugação à 2400 G por 3 minutos e congelamento 1; R10-Centrifugação à 800 G por 10 minutos e congelamento 1. Após o descongelamento, as médias registradas para motilidade espermática total e vigor do sêmen foram $44,0 \pm 10,3$ e $3,1 \pm 0,4$; $44,3 \pm 7,7$ e $3,0 \pm 0,3$; $39,2 \pm 10,2$ e $2,9 \pm 0,4$; $38,0 \pm 9,2$ e $2,9 \pm 0,4$ respectivamente para os tratamentos M3, M10, R3 e R10, não havendo diferença entre os mesmos ($p > 0,05$). Os valores médios nos diferentes tratamentos não apresentaram diferença em relação aos testes supravital ($39,9 \pm 7,9$; $40,1 \pm 8,1$; $37,3 \pm 7,0$; $36,5 \pm 6,8$; respectivamente para M3, M10, R3e R10), hiposmótico, número de espermatozoides ligados a membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha e morfologia espermática ($p > 0,05$). Não houve interação entre curva de congelamento e

centrifugação, sendo então analisadas de forma independente. No presente estudo foi observado que tanto a curva de congelamento quanto o regime de centrifugação influenciam na qualidade espermática pós-descongelamento, sendo que centrifugações com tempos mais curtos e curvas de congelamento com queda de temperatura controlada por máquina são as mais indicadas para minimizar as injúrias espermáticas.

ABSTRACT

SHIOMI, Hugo Hideki, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013.
Cryopreservation of Piau swine breed sperms: Evaluation of freezing curves and centrifugations Adviser: José Domingos Guimarães.

The maintenance of naturalized swine breeds is very important for the Brazilian pork production industry, due to the potential source of new genetic variants. The Piau breed is considered one of the best and the most important Brazilian domestic naturalized swine breeds. Thus, research towards developing protocols for freezing semen is essential in order to create germplasm banks and protect the endangered swine breeds. Protocols for boar semen cryopreservation require the centrifugation of semen in order to separate sperm cells from the seminal plasma, nevertheless it has not been main focus on many studies. The aim on this study was to evaluate the effect of centrifugation and freezing curve in cryopreservation protocol on after thawing sperm viability of Piau swine breed (*Sus scrofa*), through assessment *in vitro* tests. Six ejaculates from five Piau boars were used, with ages ranging from 1.5 to 5.0 years, approved by andrologic examination, 30 samples in total. The semen collections were performed using the method of stimulation with a gloved hand with the aid of a dummy or a sow in natural estrus. Two centrifugations (800 G for ten minutes and 2400 G for three minutes) and two freezing curves (with conventional nitrogen vapor- freezing 1 and controlled by a programmed freezing machine- freezing 2) were tested. So the treatments were divided into M3- centrifugation at 2400 G for 3 minutes and freezing 2; M10- centrifugation at 800 G for 10 minutes and freezing 2; R3-centrifugation at 2400 G for 3 minutes and freezing 1; R10- centrifugation 800 for 10 minutes and freezing 1. After thawing, the averages recorded for total sperm motility and vigor of semen were 44.0 ± 10.3 and 3.1 ± 0.4 ; 44.3 ± 7.7 and 3.0 ± 0.3 ; 39.2 ± 10.2 and 2.9 ± 0.4 ; 38.0 ± 9.2 and 2.9 ± 0.4 respectively for treatments M3, M10, R3 and R10, with no difference between the groups ($p > 0.05$). The mean values in the different treatments did not differ regarding supravital test (39.9 ± 7.9 ; 40.1 ± 8.1 ; 37.3 ± 7.0 ; 36.5 ± 6.8 , respectively to M3, M10, R3 and R10), hypoosmotic, the number of sperm bound perivitelline membrane of chicken egg yolk and morphology ($p > 0.05$). No interaction between freezing curve and centrifugation force was detected, hence the further individual analysis. In the present study it was observed that both the curve and the freezing spin regime influence on after thawing sperm quality, and shorter centrifugation periods and

freezing rates decrease with temperature controlled by machine are the most suitable to decrease sperm injuries.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, dentre as raças suínas nativas catalogadas como de alto risco de extinção, a raça Piau (*Sus scrofa*) está entre as melhores e mais importantes raças naturalizadas nacionais, sendo uma das poucas raças nativas que ainda existe no país. A manutenção das chamadas raças naturalizadas de suínos é fundamental, visto que, tais raças apresentam características próprias de adaptação aos ecossistemas brasileiros, além de constituírem fontes potenciais de novas variantes genéticas de extrema importância para a suinocultura nacional (Garcia e Barbosa, 1994; Sollero *et al.*, 2009).

Vários órgãos internacionais estão empenhando esforços no sentido de preservar e melhorar geneticamente as diferentes raças de animais, muitas das quais em via de extinção. Entretanto, a maioria dessas raças, por cruzamentos absorventes ou por substituição, deu lugar a outras que, por serem mais produtivas e melhoradas geneticamente, contribuíram para redução das populações de animais nativos (Pereira, 2004).

A maioria dos estudos da raça refere-se aos aspectos de desempenho reprodutivo das fêmeas, desenvolvimento ponderal dos leitões, qualidade de carcaça e tendências genéticas de algumas características produtivas e reprodutivas da raça (Garcia e Barbosa, 1994; Pereira, 2004). Quanto às pesquisas genéticas, foram realizados estudos sobre polimorfismo do gene do hormônio de crescimento suíno (Wenceslau *et al.*, 2001; Faria *et al.*, 2006), de genes relacionados com a obesidade (Soares *et al.*, 2006), e a identificação de genes expressos no músculo *longissimus dorsi* durante o desenvolvimento muscular fetal (Sollero *et al.*, 2011). Em relação aos varrões da raça Piau, Barros *et al.* (2012a) estudou as características qualitativas e quantitativas do sêmen e Pinho *et al.* (2012) realizaram testes de ligação de espermatozóides a membrana perivitelina do ovo da gema de galinha.

No âmbito da conservação das espécies, a criopreservação de sêmen associada a outras biotecnologias apresenta-se como importante ferramenta para a manutenção de recursos genéticos (Andrabi e Maxwell, 2007). Porém, segundo Mileham *et al.* (1997) o menor desempenho reprodutivo associado com o uso de sêmen criopreservado é a razão para seu uso limitado em granjas comerciais. No entanto, quando métodos adequados de criopreservação são utilizados em sêmen de suínos, taxas de motilidade espermática pós-descongelamento de 35-55% têm sido obtidas (Fiser *et al.*, 1993; Rodríguez-Martinez, 1996; Woelders e Den Besten, 1996; Ohata *et al.*, 2001; Ohata *et al.*, 2005; Bianchi *et al.*,

2008; Barros *et al.*, 2012b) sugerindo que bons desempenhos podem ser alcançados com uso dos protocolos utilizados pelos autores.

As pesquisas na área de criopreservação de sêmen, efetuadas durante os últimos trinta anos, resultaram em avanços, sobretudo, referentes a diferentes crioprotetores, embalagens de congelamento, diluentes e curvas de congelamento e descongelamento (Antunes, 2007). No entanto, o emprego de sêmen congelado ainda está associado à redução de 10 a 20% na taxa de parto e de 1 a 2 leitões por leitegada (Johnson *et al.*, 2000), índices reprodutivos insatisfatórios, quando comparados aos obtidos com o emprego de sêmen resfriado (Almlid e Hofmo, 1996; Woelders, 1997).

Devido à baixa fertilidade, grande variabilidade na resposta dos machos suínos ao congelamento e aos altos custos por dose produzida, a inseminação artificial com sêmen congelado tende a se restringir à exportação de sêmen entre países e à formação de bancos de sêmen de raças ou linhagens de alto valor genético, ou que se encontram em via de extinção ou em risco sanitário (Andrade *et al.*, 2007). O uso de sêmen congelado de machos de alto mérito genético também é utilizado para repopulação de determinadas espécies após ocorrência de desastres naturais, por exemplo, surtos de doenças (Johnson *et al.*, 2000). Adicionalmente, segundo Smits (2006) a questão sanitária, que a cada dia torna-se alvo de negociações internacionais interferindo no mercado de carne suína global, é apontada como grande vantagem competitiva em favor do uso do sêmen congelado.

No desenvolvimento de protocolos de congelamento de sêmen suíno tem-se que considerar a interação entre a concentração de crioprotetor no diluente e a velocidade de congelamento/descongelamento, que sabidamente devem ser otimizadas em conjunto (Johnson *et al.*, 2000).

Os trabalhos de pesquisa desenvolvidos nos últimos anos mostram que o glicerol é o melhor crioprotetor para sêmen de suínos, mas a sua concentração não pode exceder 6% devido a toxicidade do mesmo para os espermatozoides, sendo a concentração de 3 a 4% a mais recomendada (Holt *et al.*, 2005). A velocidade de congelamento deve ser $-30^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$ e a velocidade de descongelamento de $1200^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$. Outro aspecto se refere à embalagem de estocagem, na qual o envase, que deve ser efetuado em palhetas de 0,5 mL, pois os resultados são superiores a pellets ou macrotubulos (Johnson *et al.*, 2000).

A utilização de diversos crioprotetores e suas associações pode minimizar e controlar os processos deletérios que ocorrem na célula espermática durante o congelamento e descongelamento, possibilitando desta forma, resultados mais satisfatórios de motilidade e viabilidade espermática pós-descongelamento e conseqüentemente

melhora das taxas de prenhes (Rossi *et al.*, 2003). Estudos recentes compararam glicerol e diferentes amidas com o objetivo de verificar um crioprotetor menos tóxico para a célula espermática e com menos efeitos contraceptivos (Gomes *et al.*, 2002 a, b; Henry *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2002; Vidament *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2004). Desta forma, as pesquisas em reprodução suína e o desenvolvimento de protocolos de congelamento de sêmen são imprescindíveis para melhorar os índices do sêmen congelado e para a formação de bancos de germoplasma de raças suínas em risco de extinção.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos de duas diferentes centrifugações associadas com duas curvas de congelamento sobre a qualidade espermática pós-descongelamento em suínos da raça Piau.

REVISÃO DE LITERATURA

Criopreservação de sêmen

A criopreservação cessa a atividade celular e aumenta o tempo de vida dos espermatozóides, todavia, induz a formação de cristais de gelo nos ambientes intra e extracelulares, causa estresse térmico com mudanças drásticas de temperatura, leva ao estresse osmótico e tóxico derivado da exposição aos crioprotetores, gerando vários danos espermáticos, principalmente de membrana plasmática (Mazur, 1985).

O estresse inicial se dá quando o espermatozóide é submetido á temperatura de refrigeração a 5°C (Squires *et al.*, 1999), devido à fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel (Graham, 1996; Medeiros, 2002), mas na espécie suína essa transição parece começar ocorrer já em temperaturas abaixo de 15°C . O desafio celular durante o congelamento e descongelamento não é a capacidade da célula suportar temperatura muito baixa, mas de atravessar uma das fases críticas do processo (de -15 a -60°C). As células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo que determina a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com conseqüente desidratação celular (Holt, 2000).

Os lipídeos da membrana plasmática respondem às mudanças de temperatura com mudança de fase. Em temperaturas fisiológicas coexistem regiões na membrana tanto no estado fluido como em gel, porém as reduções de temperatura favorecem a transição de fase fluida para a fase gel. (Holt, 2000).

Como os espermatozóides não são adaptados para serem submetidos às mudanças de temperatura durante a criopreservação, não conseguem modificar sua composição

lipídica para se adaptarem às condições (Hazel, 1989). Essa capacidade de transição de fase é espécie dependente, o que poderia explicar as variações de sensibilidade à criopreservação de espermatozóides de diferentes espécies. Isso é evidenciado durante o processo de congelamento-descongelamento, no qual as membranas espermáticas devem ser submetidas às transições de fase. Holt (2000) obtiveram evidências que a transição de fase deve ser relacionada com a manifestação de crioinjúrias durante o descongelamento dos espermatozóides.

A bicamada lipídica da membrana do espermatozóide suíno apresenta diferenças em relação às outras espécies que podem explicar a maior susceptibilidade do mesmo ao choque pelo resfriamento (Watson, 1995; Buhr e Pettitt, 1996). Entre as principais diferenças pode-se citar uma menor porcentagem de moléculas de colesterol (Paulenz *et al.*, 1999) e sua distribuição de maneira assimétrica na membrana, tendo uma maior quantidade na monocamada interna do que na monocamada externa (Johnson *et al.*, 2000), uma quantidade menor de fosfatidilcolina e uma quantidade maior de fosfatidiletanolamina e esfingomielina, além de diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios que possuem poucas duplas ligações do tipo *cis*.

Estas diferenças estruturais ajudam a explicar a alta sensibilidade do espermatozóide suíno ao choque pelo frio, que leva a um aumento da permeabilidade da membrana e conseqüente perda de cátions e enzimas através da mesma, redução da atividade enzimática e dos processos de difusão controlados pela membrana e mudanças no movimento lateral de canais (Johnson *et al.*, 2000).

Centrifugação

As injúrias causadas pela centrifugação são atribuídas ao trauma mecânico nas membranas dos espermatozóides (Alvarez *et al.*, 1993) e indiretamente aos danos provocados pela formação excessiva de ROS (espécies reativas de oxigênio) (Aitken e Clarkson, 1988; Mortimer, 1991).

Altas concentrações de ROS estão associadas aos danos de membrana espermática por meio da peroxidação lipídica, o qual pode alterar a função espermática, levando à perda de motilidade e viabilidade espermática e conseqüentemente reduzir a fertilidade (Shekarriz *et al.*, 1995). Quanto mais intensa e longa a peletização, maior produção de ROS e mais danos aos espermatozóides (Katkov e Mazur, 1998), sendo que a exposição intensa aos ROS tem maior influencia nos danos celulares quando comparada às altas acelerações na centrifugação.

Curva de congelamento

A curva de congelamento deve ser lenta o suficiente para permitir que a água seja transportada por osmose para o meio extracelular, prevenindo a formação de gelo intracelular que causa danos irreversíveis nas células espermáticas (Fisher e Fairfull, 1986).

Quando o processo de congelamento é muito lento ocorre a congelamento da água extracelular com a conseqüente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico e determinando perda rápida da água, o que leva à desidratação celular e ao aumento da concentração de soluto extracelular. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda suficiente de água, promovendo, com isso, a formação de cristais de gelo intracelular (Mazur, 1985). A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar grandes canais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (Squires *et al.*, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken R.J., Clarkson J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining of the efficiency of sperm preparation technique. **Journal of Andrology**, v.9, p.367–376, 1988.

Almlid T., Hofmo P.O. A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 169-173, 1996.

Alvarez J.G., Lasso J.L., Blasco L., Nunez R.C., Heyner S., Caballero P., Storey B.T. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile life. **Human Reproduction**, v.8, p.1087–1092, 1993.

Andrabi S., Maxwell W. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal of Reproduction Science**, v.99, p.223–243, 2007.

Andrade A.F.C., Arruda R.P., Celeghini E.C.C., Nascimento J., Martis S.M.M.K., Moretti A.S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrossomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.190-194, 2007.

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

Barros M.H.C., Shiomi H.H., Amorim L.S., Guimarães S. E. F., Lopes P. S., Siqueira J. B. Pinho R.O., Guimarães J. D. Características quantitativas e qualitativas do sêmen in natura de suínos da raça Piau. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.10, p.1-17, 2012 a.

Barros M.H.C, Shiomi H.H., Amorim L.S.,Guimarães S.E.F., Lopes P.S., Siqueira J.B, Guimarães, J.D. Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*) submetido a três protocolos de congelamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.4, p.914-922, 2012 b.

Buhr M.M., Pettitt M.J. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.147-152, 1996.

Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, 389-396, 2004.

Faria D.A., Guimarães S.E.F., Lopes P.S. *et al.* Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, vol.29, no.4, São Paulo, 2006.

Fiser P.S., Fairfull R.W., Panich P.L. Glycerol equilibration time revisited. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.141-146, 1996.

Garcia S.K., Barbosa A.S. Características etiológicas, biométricas e seminais de varrões da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.279-289, 1994.

Gomes G.M., Jacob J.C.F., Medeiros A.S.L., Papa F.O., Alvarenga M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

Gomes G.M., Papa F.O., Jacob J.C.F., Macedo L.P., Leão K.M., Machado M.S., Alvarenga M.A. Melhoria dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento com o meio MP50 para sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.3, 2002.

Graham, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.

Hazel, J.R. Cold adaptation in endotherms: regulation of membrane function and cellular metabolism. In: Wang, L.C.H. _Ed., **Advances in Comparative and Environmental Physiology**, Springer-Verlag, Berlin, vol. 4, p.1-50, 1989.

Henry M., Snoeck P.P.N., Cottorelo A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.58, p.245-248, 2002.

Holt W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

Holt W.V. Germplasm cryopreservation in elephants and wild ungulates. In: Watson, P.F., Holt W.V. (Eds.), **Cryobanking the Genetic Resource, Wildlife Conservation for the Future**, 1st edition, London, p.318-346, 2001.

Holt W.V., Medrano, A., Thurston, L.M., Watson, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v.63, p.370-382, 2005.

Johnson L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.

Katkov I.I., Mazur P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, p.232-241, 1998.

Mazur P. Basic concepts in freezing cell. In: Deep freezing of boar semen, 1985, Uppsala. **Proceedings**. Uppsala, p.199-222, 1985.

Medeiros A.S.L., Gomes G.M., Carmo M.T., Papa F.O., Alvarenga M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.

Medeiros C.M.O., Forell, F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

Mileham A.J., Haven D., Rohl J., Van Der Steen H.A.M. Porcine semen cryopreservation in a commercial setting. **In: International Conference on Pig Reproduction, 5. Proceedings**, Kerkrade, Netherlands, p.128, 1997.

Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of invitro fertilization. **Human Reproduction**, v.6, p.173–176, 1991.

Paulenz H., Taugbol O., Kommisrud E., Grevle I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.431-435, 1999.

Pereira J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**, 4 ed., belo horizonte: fepmvz editora, 2004.

Pinho R.O., Shiomi H.H., Lima D.M.A., COSTA E.V., Santos M., Lopes P.S. , Guimarães J. D., Guimarães S.E.F. Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal (Impresso)**, v. 36, p. 245, 2012.

Pursel V.G., Johnson L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, p.99–102, 1975.

Rodríguez-Martínez H., Eriksson B., Lundeheim N. Freezing boar semen in flat plastic bags: membrane integrity and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 161-168, 1996.

Rossi T.C., Papa F.O., Santos T.B., Macedo L.P., Alvarenga M.A., Melo C.M., Dell’Aqua Jr. JA. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.3, 2003.

Shekarriz M., De Wire D.M., Thomas A.J.Jr., Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**, v.28, p.31–35, 1995.

Smits H. O futuro da inseminação artificial. **Suíno & Cia**, v.4, n.17, p.54-56, 2006.

Soares M.A.M., Guimarães S.E.F., Euclides R.F., *et al.* Novos polimorfismos nos genes da obesidade em raças divergentes de suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.401-407, 2006.

Sollero B.P., Paiva S.R., Faria D.A, Guimarães S.E.F, Castro S.T.R., Egito A.A., Albuquerque M.S.M., Piovezan U., Bertani G.R., Mariante A.S. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v.123(1), p.8-15, 2009.

Sollero B. P., Guimarães S. E. F., Rilmington V. D., Tempelman R. J. , Raney N.E., Steibel J. P., Guimarães J. D., Lopes P. S., Lopes M. S., Ernst C. W. Transcriptional profiling

during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs. **Animal Genetics** (Print), v.42, n. 6, p.600-612, 2011.

Squires E.L.*et al.* Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056-1065, 2004.

Squires E.L., Pickett B.W., Graham J.K., Vanderwall D.K., McCUE P.M., Bruemmer J. **Cooled and frozen Stallion Semen**, Fort Collins: Colorado State University, 1999, 80p.

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 dimethylformamide. **Theriogenology**, v.58, p.249-251, 2002.

Wenceslau A. A., Guimarães S. E. F., Lopes P. S. *et al.* Estudo de polimorfismos no PGH em suínos da raça Piau. In: 38o. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001, Piracicaba - Sp. **Anais da 38o. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2001.

Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

Westendorf P., Ritcher L., Treu H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Laborund Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Paillettenverfahren. **DtschTiera"rztl Wschr**, v. 82, p.261-267, 1975.

Woelders H., Matthus A., Den Besten M. Boar variation in "freezability" of the semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.1, p.153-159, 1996.

Woelders H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v.19, n.3, p.135-138, 1997.

**CAPITULO I - CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS DA
RAÇA PIAU: AVALIAÇÃO DE CURVAS DE CONGELAMENTO E DE
CENTRIFUGAÇÕES**

RESUMO

O objetivo no presente estudo foi avaliar o efeito do tempo de centrifugação e da curva de congelamento em protocolo de criopreservação sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*), por meio de testes de avaliação *in vitro*. Foram utilizados seis ejaculados de cinco varrões da raça Piau, com idades variando de 1,5 a 5,0 anos, aprovados por meio de exame andrológico, totalizando 30 amostras. As coletas de sêmen foram realizadas utilizando o método da estimulação com a mão enluvada com auxílio de um manequim ou uma fêmea em estro natural. Foram testadas duas centrifugações (800 G por dez minutos e 2400 G por três minutos) e duas curvas de congelamento (convencional com vapor de nitrogênio - congelamento 1 e controlada por uma máquina de congelamento programada- congelamento 2). Dessa forma os tratamentos foram divididos em M3-Centrifugação à 2400 G por 3 minutos e congelamento 2; M10- Centrifugação à 800 G por 10 minutos e congelamento 2; R3- Centrifugação à 2400 G por 3 minutos e congelamento 1; R10-Centrifugação à 800 G por 10 minutos e congelamento 1. Após o descongelamento, as médias registradas para motilidade espermática total e vigor do sêmen foram $44,0 \pm 10,3$ e $3,1 \pm 0,4$; $44,3 \pm 7,7$ e $3,0 \pm 0,3$; $39,2 \pm 10,2$ e $2,9 \pm 0,4$; $38,0 \pm 9,2$ e $2,9 \pm 0,4$ respectivamente para os tratamentos M3, M10, R3 e R10, não havendo diferença entre os mesmos ($p > 0,05$). Os valores médios nos diferentes tratamentos não apresentaram diferença em relação aos testes supravital ($39,9 \pm 7,9$; $40,1 \pm 8,1$; $37,3 \pm 7,0$; $36,5 \pm 6,8$; respectivamente para M3, M10, R3e R10), hiposmótico, número de espermatozóides ligados a membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha e morfologia espermática ($p > 0,05$). Não houve interação entre curva de congelamento e centrifugação, sendo então analisadas de forma independente. No presente estudo foi observado que tanto a curva de congelamento quanto o regime de centrifugação influenciam na qualidade espermática pós-descongelamento, sendo que centrifugações com tempos mais curtos e curvas de congelamento com queda de temperatura controlada por máquina são as mais indicadas para minimizar as injúrias espermáticas.

ABSTRACT

The aim on this study was to evaluate the effect of centrifugation and freezing curve in cryopreservation protocol on after thawing sperm viability of Piau swine breed (*Sus scrofa*), through assessment *in vitro* tests. Six ejaculates from five Piau boars were used, with ages ranging from 1.5 to 5.0 years, approved by andrologic examination, 30 samples in total. The semen collections were performed using the method of stimulation with a gloved hand with the aid of a dummy or a sow in natural estrus. Two centrifugations (800 G for ten minutes and 2400 G for three minutes) and two freezing curves (with conventional nitrogen vapor- freezing 1 and controlled by a programmed freezing machine- freezing 2) were tested. So the treatments were divided into M3- centrifugation at 2400 G for 3 minutes and freezing 2; M10- centrifugation at 800 G for 10 minutes and freezing 2; R3-centrifugation at 2400 G for 3 minutes and freezing 1; R10- centrifugation 800 for 10 minutes and freezing 1. After thawing, the averages recorded for total sperm motility and vigor of semen were 44.0 ± 10.3 and 3.1 ± 0.4 ; 44.3 ± 7.7 and 3.0 ± 0.3 ; 39.2 ± 10.2 and 2.9 ± 0.4 ; 38.0 ± 9.2 and 2.9 ± 0.4 respectively for treatments M3, M10, R3 and R10, with no difference between the groups ($p > 0.05$). The mean values in the different treatments did not differ regarding supravital test (39.9 ± 7.9 ; 40.1 ± 8.1 ; 37.3 ± 7.0 ; 36.5 ± 6.8 , respectively to M3, M10, R3 and R10), hypoosmotic, the number of sperm bound perivitelline membrane of chicken egg yolk and morphology ($p > 0.05$). No interaction between freezing curve and centrifugation force was detected, hence the further individual analysis. In the present study it was observed that both the curve and the freezing spin regime influence on after thawing sperm quality, and shorter centrifugation periods and freezing rates decrease with temperature controlled by machine are the most suitable to decrease sperm injuries.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a raça Piau é considerada uma das melhores e mais importantes raças naturalizadas dentre as raças suínas nativas, porém estão catalogadas como de alto risco de extinção (Garcia e Barbosa, 1994). Cruzamentos absorventes e ou substituições dos animais do rebanho, visando melhorar os índices produtivos, resultaram em aumento da população de animais de outras raças, mais produtivas e melhoradas geneticamente, em detrimento das raças nativas (Pereira, 2004; Sollero *et al.*, 2009).

Considerando o risco de extinção, a manutenção das chamadas raças naturalizadas de suínos é imprescindível por constituírem fontes potenciais de novas variantes genéticas e por serem adaptadas ao ecossistema nativo. Entre as raças suínas catalogadas como de alto risco de extinção, a raça Piau é uma das poucas que ainda existe (Sollero *et al.*, 2009), sendo essencial um planejamento para programas de conservação de recursos genéticos.

No âmbito da conservação de espécies, a criopreservação de sêmen associada a outras biotecnologias apresenta-se como importante ferramenta para a manutenção de recursos genéticos (Andrabi e Maxwell, 2007), principalmente de animais em ameaça de extinção como os animais da raça Piau. Os benefícios do banco de germoplasma são bem conhecidos (Holt, 2001) e a criopreservação de sêmen representa uma excelente forma de conservação de material genético (Johnson *et al.*, 2000). Entretanto, o êxito da criopreservação de sêmen depende de vários fatores, incluindo a qualidade inicial do sêmen, protocolo de congelamento e diluentes utilizados (Johnson *et al.*, 2000; Holt *et al.*, 2005).

A criopreservação cessa a atividade celular e aumenta o tempo de vida dos espermatozoides (Mazur, 1985), todavia, induz a formação de cristais de gelo nos ambientes intra e extracelulares, causa estresse térmico com mudanças drásticas de temperatura, leva ao estresse osmótico e tóxico devido à exposição aos crioprotetores, gerando vários danos espermáticos, principalmente de membrana plasmática.

A criopreservação de sêmen suíno com os métodos atuais resulta em perdas na viabilidade espermática, geralmente mais de 50% dos espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelamento-descongelamento (Almlid e Hofmo, 1996). Essa redução é atribuída tanto às mudanças de temperatura quanto à manipulação do sêmen durante a centrifugação. Os principais problemas causados pela centrifugação são a perda espermática devido à remoção do sobrenadante (Katkov e Mazur, 1998) e as injúrias físicas causadas na população espermática (Alvarez *et al.*, 1993).

Na criopresevação de sêmen suíno, a centrifugação é uma etapa necessária antes do congelamento, facilitando a remoção do plasma seminal e concentrando os espermatozóides para a posterior ressuspensão com os meios de congelamento (Carvajal *et al.*, 2004). Vários regimes de centrifugação foram adotados na pesquisa de criopresevação do sêmen suíno: 300 G por 10 minutos (Pursel e Johnson, 1975); 800 G por 10 minutos (Westendorf *et al.*, 1975); 800 G por 15 minutos (Paquignon e Courrot, 1976) e 1400 G por cinco minutos (Larson *et al.*, 1977), sendo que os dois primeiros citados são os mais utilizados comercialmente.

Considerando o exposto anteriormente, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos de duas diferentes centrifugações associadas com duas curvas de congelamento sobre a qualidade espermática pós-descongelamento em suínos da raça Piau.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Granja de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa-MG (GMS/DZO/UFV), no período de março a setembro de 2011, com projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais- CEUA/UFV. O município está localizado a 20°45'45" latitude Sul e 42°52'04" a Oeste de Greenwich, altitude média é de 690 m, temperatura média anual de 20,9 °C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo CWA (inverno seco e verão chuvoso) pela classificação de Köppen.

O delineamento experimental foi arranjado em fatorial 2 x 2, com duas centrifugações e duas curvas de congelamento.

Foram utilizados seis ejaculados de cinco varrões da raça Piau, com idades variando de 1,5 a 5 anos, aprovados por meio de exame andrológico, totalizando 30 amostras. As coletas de sêmen foram realizadas utilizando o método da estimulação com a mão enluvada (Hancock e Hovell, 1959) com auxílio de um manequim ou uma fêmea em estro natural. A fração rica de espermatozóides foi coletada em copos plásticos descartáveis de 700 mL, protegidos em embalagens térmicas previamente aquecidas a 37°C, com filtro de gaze para retenção da fração gelatinosa do ejaculado.

A motilidade espermática progressiva (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de 0 a 5) foram avaliadas acondicionando uma alíquota de 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C e analisando em microscópio de luz em aumento de 200 a 400x.

Após a avaliação do sêmen *in natura*, foram realizados os procedimentos de criopreservação de acordo com os protocolos dos tratamentos descritos a seguir. Somente foram submetidos ao processo de criopreservação, ejaculados com concentração $\geq 200 \times 10^6$ espermatozoides/mL, $\geq 85\%$ de espermatozoides com morfologia normal, $\geq 75\%$ de motilidade espermática total (Roca *et al.*, 2010).

A fração rica em espermatozoides do ejaculado foi diluída em 1:1 em meio *Beltsville Thawing Solution* (BTS) e mantido à temperatura de 25°C por 60 minutos. Posteriormente foi submetido à temperatura de 15°C durante 60 minutos (Bianchi *et al.*, 2008) e ao final deste período, cada ejaculado foi dividido em duas frações, uma delas centrifugada a 800 G por 10 minutos (Ohata *et al.*, 2005) e a outra a 2400 G por três minutos (Carvajal *et al.*, 2004), ambas a 15°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os espermatozoides ressuspensos com o diluente de resfriamento (DR), composto por 80% (vol/vol) de solução de β -lactose (310 mM em água), 20% (vol/vol) gema de ovo, e 100 μ g/mL de sulfato de kanamicina. A concentração de espermatozoides no pellet foi estimada utilizando a câmara de Neubauer, possibilitando a determinação do volume de ressuspensão do DR necessário para atingir a concentração de 600×10^6 espermatozoides/mL. O pellet ressuspensado foi mantido a 5°C por 90 minutos (Ohata *et al.*, 2001) e após esse período foi adicionado 1 mL de diluente de congelamento (DC) com 6% de glicerol (72,5 mL de lactose a 11%; 20 mL de gema de ovo; 6 mL de glicerol e 1,5 mL de Orvus-es-paste–Equex) para cada 2 mL de DR, até atingir uma concentração final de 400×10^6 espermatozoides/mL e uma concentração final de 2,0% de glicerol (considerando a equação: $C1V1=C2V2$, onde C=concentração e V=volume). Posteriormente, o envase foi realizado em palhetas de 0,5 mL com 200×10^6 espermatozoides viáveis.

Posteriormente, as amostras de sêmen envasadas foram submetidas a duas curvas de congelamento. Na primeira foi utilizada a rampa de nitrogênio, sendo as palhetas mantidas a 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido (-120°C) durante 20 minutos e posteriormente submersas em nitrogênio líquido (-196°C) (congelamento 1). No segundo, as palhetas foram submetidas a uma queda gradativa de temperatura controlada por uma máquina de congelamento programada (Cryogen, Neovet®, Brasil), conforme a seguinte curva de congelamento, modificado de Roca *et al.* (2010): de 5°C a -5°C foi utilizada a curva de congelamento de -6°C/min; de -5°C a -80°C a curva foi de -40°C/min; mantida à -80°C por 30 segundos; de -80°C a -100°C utilizou-se a curva de -70°C/min e

posteriormente submersas em nitrogênio líquido e estocadas a -196°C . Dessa forma os tratamentos foram divididos em:

- M3 : Centrifugação à 2400 G por três minutos e congelamento 2 (máquina);
- M10: Centrifugação à 800 G por 10 minutos e congelamento 2 (máquina);
- R3: Centrifugação à 2400 G por três minutos e congelamento 1 (rampa);
- R10: Centrifugação à 800 G por 10 minutos e congelamento 1 (rampa);

Após serem submersas no nitrogênio líquido (-196°C), todas as amostras permaneceram nessa condição em botijões de congelamento de sêmen por pelo menos 48 horas antes do descongelamento.

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 38°C , por 20 segundos e ressuspensas com 1,25 mL de diluente BTS (Maxwell e Johnson, 1997). Foi realizado o teste de termo-resistência (TTR) pela incubação do sêmen pós-descongelamento em banho-maria à 38°C , por 120 minutos, avaliando-se motilidade espermática total, vigor espermático e o percentual de espermatozóides vivos pela coloração supravital imediatamente após o descongelamento e posteriormente aos 30, 60, 90 e 120 minutos após o descongelamento (teste supravital). Além dessas avaliações, as amostras de sêmen dos quatro protocolos também foram avaliadas quanto à morfologia espermática, integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HO), integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal por sondas fluorescentes (FLUO) e teste de ligação de espermatozóides à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPVOG).

A avaliação de células vivas e mortas foi realizada pelo teste de coloração supravital utilizando solução de eosina (1%) e nigrosina (5%), conforme descrito por Bamba (1988).

Em um tubo plástico de 1,5 mL (eppendorph[®]) contendo 1 mL de solução de formol salina tamponada foram adicionadas alíquotas do ejaculado suficiente para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozóides por meio de preparação úmida, com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x (sob uma gota de óleo de imersão). Foram analisadas 400 células por ejaculado, determinando-se o percentual de espermatozóides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda, tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) e classificados em defeitos espermáticos maiores (DEFM), menores (DEFMEN) e totais (DEFT) conforme os critérios classificados por Blom (1973).

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HO) rápido descrito para espermatozóides de suínos por Perez-Llano *et al.* (2001). Uma alíquota de 100 µL do sêmen descongelado em meio BTS foi incubado a 37°C por 30 minutos em solução de BTS a 75 mOsm/Kg. Após o término do tempo de incubação, as amostras foram fixadas em 0,5 mL de solução formol-salina tamponada. Posteriormente, uma alíquota de 20µL da solução foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 100 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada e o resultado foi determinado em porcentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula: $HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HO})$ (Melo e Henry, 1999).

A avaliação da membrana plasmática do espermatozóide e da membrana acrossomal das amostras de sêmen congelado/descongelado foi realizada com associação de duas sondas fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo), conforme protocolo empregado por Harrison e Vickers (1990). As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C e incubadas por oito minutos em presença das sondas. Posteriormente, em microscopia de epifluorescência utilizando microscópio Olympus – Modelo BX 60F5, equipado com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410nm), com um aumento de 400x, foram analisados 100 espermatozóides, classificados em íntegros, semilesados e lesados. Os espermatozóides íntegros coram-se pelo diacetato de carboxifluoresceína (verdes em toda extensão), os semilesados, o acrossomo e a membrana coram-se pelo diacetato de carboxifluoresceína, mas o núcleo cora-se com iodeto de propídeo (vermelho) e os lesados coram-se de vermelho.

Para avaliar a fertilidade *in vitro* do sêmen congelado/descongelado foi realizado o teste de ligação dos espermatozóides à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha, conforme metodologia descrita por Barbato (1998). A membrana perivitelínica foi preparada pela separação da gema da clara do ovo, removendo o excesso de clara usando um papel toalha. A gema intacta foi colocada sobre um pedaço de parafilme, sendo delicadamente rompida e lavada com BTS. A membrana removida do parafilme foi colocada em placas de Petri para sucessivas lavagens com BTS que ficasse limpa; posteriormente foi esticada delicadamente e cortada em pequenos quadrados (1 cm²), usando uma cubeta de espectrofotômetro como molde. Cada pedaço foi alocado em um

tubo de cultura (10 mL) contendo 1 mL de BTS. Cada quadrado da membrana foi inseminado com 10 μ L de sêmen na concentração de 20×10^6 espermatozoides/ mL.

A membrana com os espermatozoides foi incubada por 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Agitando-se suavemente após 30 minutos. Neste momento foi acrescentado 1 μ L de Hoechst 33342 (1mg/mL de água), para corar o núcleo dos espermatozoides. Depois da incubação, a membrana foi colocada em um tubo contendo 1mL de BTS, e as membranas foram lavadas três vezes com BTS. A membrana foi acondicionada sobre uma lâmina, esticando delicadamente para remover possíveis dobras, foram cobertas com lamínulas e examinadas utilizando microscópio Olympus – Modelo BX 60F5, equipado com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410nm), com um aumento de 400x. Foram observados os espermatozoides aderidos à membrana. Para cada membrana foram contados todos os espermatozoides aderidos em seis microcampos aleatórios, e posteriormente determinado o percentual de espermatozoides aderidos, de acordo com procedimentos empregados por Barbato *et al.* (1998).

Para a análise estatística, foi utilizado o software SAEG versão 9.1. (SAEG-UFV, 2007). Análises descritivas quanto às médias, desvios-padrões e coeficientes de variação foram realizadas para todas as variáveis estudadas. O teste Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias entre grupos de tratamento foram estudadas utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para verificar possíveis diferenças entre os grupos experimentais e em relação aos testes complementares, aspectos físicos e morfológicos do sêmen. Quando foi detectado efeito pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para as variáveis que não atenderam as premissas de normalidade dos dados obtidos e homogeneidade das variâncias entre os grupos, os dados foram analisados pela análise não paramétrica e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis (5%).

A análise de regressão foi utilizada para se verificar o comportamento dos aspectos físicos do sêmen durante as 3 horas de incubação no teste de termo-resistência lento. Correlação simples de Pearson foi realizada entre as características seminais e os testes complementares.

RESULTADOS

Após o descongelamento, as médias registradas para motilidade espermática total do sêmen (tabela 1) foram $44,0 \pm 10,3$; $44,3 \pm 7,7$; $39,2 \pm 10,2$; $38,0 \pm 9,2$ respectivamente para os tratamentos M3, M10, R3 e R10, não havendo diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os resultados médios de motilidade espermática (41,4) e de SV (38,5) encontram-se dentro do intervalo de confiança verificado em outros estudos realizados na área de criopreservação de sêmen suíno.

Na tabela 1 é observado que os valores médios nos diferentes tratamentos não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) em relação aos testes SV, HOST, NEL e morfologia espermática. Em relação à porcentagem de espermatozóides classificados como íntegros pelas sondas fluorescentes, os valores médios nos tratamentos M10 e R10 foram superiores ao R3 ($P < 0,05$), mas nenhum desses tratamentos supracitados apresentou diferença com os valores do M3 ($p > 0,05$).

Na tabela 2 estão sumariados os valores médios de motilidade espermática, vigor espermático e porcentagem de espermatozóides vivos pela coloração supravital no decorrer do teste de termo-resistência lento de 120 minutos. Não houve diferença entre os tratamentos no descongelamento (tempo zero) quanto à MOT, VIG e SUP ($p > 0,05$). Ao final do TTR, houve diferença em relação à MOT, sendo que no R10 os valores médios foram inferiores aos de M3 ($P < 0,05$), mas quanto ao VIG e SUP não houve diferença ($p > 0,05$).

Tabela 1: Avaliação do sêmen de suínos da raça Piau criopreservado em diferentes protocolos

Avaliação seminal	Tratamentos			
	M3	M10	R3	R10
MOTILIDADE TOTAL (%)*	44,0±10,3 ^a	44,3±7,7 ^a	39,2±10,2 ^a	38,0±9,2 ^a
VIGOR (1-5)*	3,1±0,4 ^a	3,0±0,3 ^a	2,9±0,4 ^a	2,9±0,4 ^a
SV *	39,9±7,9 ^a	40,1±8,1 ^a	37,3±7,0 ^a	36,5±6,8 ^a
HOST**	16,0±6,0 ^a	15,8±5,7 ^a	18,6±7,8 ^a	18,4±9,5 ^a
INTEGROS**	11,2±7,2 ^a	14,7±9,2 ^{ab}	8,5±4,2 ^{ac}	15,1±10,1 ^{ab}
SEMI-LESADOS**	4,5±2,3 ^a	5,8±4,5 ^a	4,2±2,7 ^a	4,7±2,6 ^a
INTEGROS/SEMI-LESADOS**	15,7±8,3 ^a	20,5±10,4 ^{ab}	12,8±6,1 ^{ac}	19,8±10,1 ^{ab}
LESADOS**	84,3±8,3 ^a	79,5±10,4 ^{ab}	87,2±6,1 ^{ac}	80,2±10,1 ^{ab}
NEL**	861,2±845,1 ^a	838,1±802,4 ^a	614,8±509,3 ^a	701,6±665,3 ^a
EL (%)**	0,43±0,42 ^a	0,42±0,40 ^a	0,31±0,25 ^a	0,35±0,33 ^a
Defeitos Maiores* *	5,0±2,2 ^a	5,5±2,0 ^a	5,5±2,8 ^a	6,2±2,2 ^a
Defeitos Menores *	8,6±2,9	8,3±3,0	8,8±3,2	10,1±3,6
Defeitos Totais*	13,6±4,3 ^a	13,8±3,6 ^a	14,3±5,0 ^a	16,3±4,2 ^a

^{a,b}Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si (P<0,05) pelo teste de *Tukey; ** Kruskal-Wallis; Média±dp = Média e desvio padrão; SV=supravital; HOST=teste hiposmótico; NEL= número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha; EL= espermatozoides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha; M3=curva de congelamento controlada por máquina e centrifugação com 2400 G por três minutos; M10=curva de congelamento controlada por máquina e centrifugação com 800 G por 10 minutos; R3= curva de congelamento tradicional com rampa e centrifugação com 2400 G por três minutos; R10= curva de congelamento tradicional com rampa e centrifugação com 800 G por 10 minutos.

Tabela 2: Qualidade seminal pós-descongelamento durante o teste de termo-resistência em suínos da raça Piau, de acordo com os diferentes protocolos de congelamento.

TRATAMENTOS	TEMPOS DE INCUBAÇÃO (minutos)				
	0	30	60	90	120
Motilidade Espermática					
M3	44,0±10,3 ^{Aa}	34,7±10,3 ^{ABb}	29,7±11,2 ^{Abc}	23,5±0,2 ^{AcD}	19,7±10,3 ^{Ad}
M10	44,3±7,7 ^{Aa}	35,0±9,9 ^{Ab}	28,3±9,2 ^{Ac}	22,7±10,1 ^{AcD}	18,5±9,8 ^{ABd}
R3	39,2±10,2 ^{Aa}	29,0±10,9 ^{ABb}	23,5±10,4 ^{ABbc}	19,2±10,2 ^{ABcd}	14,3±9,5 ^{ABd}
R10	38,0±9,2 ^{Aa}	27,7±11,9 ^{Bb}	20,5±9,4 ^{Bc}	15,5±8,5 ^{Bcd}	12,7±9,1 ^{Bd}
Vigor espermático					
M3*	3,1±0,4 ^{Aa}	2,8±0,7 ^{Aac}	2,6±0,7 ^{Aa}	2,7±0,9 ^{Abc}	1,8±0,9 ^{Ab}
M10*	3,0±0,3 ^{Aa}	2,8±0,4 ^{Aac}	2,4±0,7 ^{ABbc}	2,2±0,8 ^{Ab}	1,8±0,9 ^{Ab}
R3*	2,9±0,4 ^{Aa}	2,6±0,6 ^{Aac}	2,2±0,7 ^{ABbc}	1,9±0,9 ^{ABd}	1,4±0,9 ^{ABd}
R10*	2,9±0,4 ^{Aa}	2,5±0,5 ^{Aac}	2,0±0,7 ^{Bbc}	1,8±0,7 ^{ABd}	1,3±0,8 ^{ABd}
Supra vital					
M3	39,9±7,9 ^{Aa}	33,0±8,2 ^{Ab}	27,7±7,7 ^{Abc}	22,5±7,7 ^{AcD}	19,0±6,7 ^{Ad}
M10	40,1±8,1 ^{Aa}	34,3±6,1 ^{Ab}	29,1±6,8 ^{Ac}	22,7±7,3 ^{Ad}	19,1±6,8 ^{Ad}
R3	37,3±7,0 ^{Aa}	30,1±7,4 ^{Ab}	24,5±8,7 ^{Ac}	20,4±7,9 ^{AcD}	14,9±8,0 ^{Ad}
R10	36,5±6,8 ^{Aa}	30,5±7,6 ^{Ab}	24,0±8,0 ^{Ac}	20,3±8,7 ^{AcD}	15,3±8,1 ^{Ad}

^{A,B}Médias de valores na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); ^{a,b}Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); *Kruskal Wallis dentro de um mesmo tratamento em função do tempo; Média±dp = Média e desvio padrão; M3=curva de congelamento controlada por máquina e centrifugação com 2400 G por três minutos; M10=curva de congelamento controlada por máquina e centrifugação com 800 G por 10 minutos; R3= curva de congelamento tradicional com rampa e centrifugação com 2400 G por três minutos; R10= curva de congelamento tradicional com rampa e centrifugação com 800 G por 10 minutos.

Tabela 3: Avaliações espermáticas pós-descongelamento em relação às curvas de congelamento e regimes de centrifugação:

Avaliação	Curva de congelamento		Regime de Centrifugação	
	M	R	800 G	2400 G
MOT	44,2±9,0 ^a	38,6±9,7 ^b	41,6±10,4 ^a	41,2±9,0 ^a
VIG	3,1±0,4 ^a	2,9±0,4 ^b	3,0±0,4 ^a	3,0±0,4 ^a
SV	40,0±7,9 ^a	36,9±6,9 ^b	38,6±7,5 ^a	38,3±7,7 ^a
HOST	*15,9±5,8 ^a	*18,5±8,6 ^a	17,3±7,0 ^a	17,1±7,8 ^a
INTEGROS	13,0±8,4 ^a	11,8±8,4 ^a	*9,8±6,0 ^b	*14,9±9,6 ^a
SEMI-LESADOS	*5,2±3,6 ^a	*4,5±2,6 ^a	*4,4±2,5 ^a	*5,2±3,7 ^a
INTEG+	18,1±9,7 ^a	16,3±9,0 ^a	*14,2±7,3 ^b	*20,1±10,1 ^a
SEMILESADOS				
LESADOS	81,9±9,7 ^a	83,7±9,0 ^a	*85,8±7,3 ^a	*79,9±10,1 ^b
NEL	*849,6±817,1 ^a	*658,2±584,0 ^a	738,0±702,8 ^a	769,8±734,0 ^a
EL (%)	*0,42±0,41 ^a	*033±0,29 ^a	0,37±0,35 ^a	0,38±0,37 ^a
Maiores	5,2±2,1 ^a	5,8±2,5 ^a	5,2±2,5 ^a	5,9±2,1 ^a
Menores	8,4±3,0 ^a	9,4±3,4 ^a	8,7±3,0 ^a	9,2±3,4 ^a
Totais	13,7±3,9 ^a	15,3±4,7 ^a	13,9±4,6 ^a	15,1±4,0 ^a

^{a,b}Médias de valores na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); Média±dp = Média e desvio padrão; *Teste de Wilcoxon (não-paramétrico); MOT= motilidade espermática pós-descongelamento; VIG= vigor espermático; SV=supravital; HOST=teste hiposmótico; NEL= número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha; EL= espermatozoides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha; Maiores= defeitos espermáticos maiores; Menores=defeitos espermáticos menores; Totais=defeitos espermáticos totais;M=curva de congelamento controlada por máquina; R curva de congelamento tradicional com rampa; 800G= centrifugação com 800 G por 10minutos; 2400 G=centrifugação com 2400 G por três minutos.

Não houve interação entre curvas de congelamento e centrifugações, sendo então analisadas de forma independente. Considerando somente a curva de congelamento, a curva de congelamento com queda de temperatura controlada por máquina programada apresentou valores superiores para MOT, VIG e SUP em relação à curva de congelamento tradicional, realizada com a rampa ($P<0,05$) e não diferiram nas demais avaliações ($p>0,05$). Considerando o regime de centrifugação, a centrifugação 2400 G por três minutos à 15°C apresentou resultado superior em relação ao percentual de espermatozoides íntegros, comparando com a centrifugação 800 G por dez minutos à 15°C ($P<0,05$).

Todos os tratamentos demonstraram quedas lineares na motilidade espermática, vigor espermático e no teste supravital. As quedas lineares de M3, M10, R3 e R10 obedeceram respectivamente às seguintes equações: $\hat{Y}=48,25 - 5,983X$, ($R^2=0,40$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=48,97 - 6,400X$, ($R^2=0,48$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=42,88 - 5,950X$, ($R^2=0,40$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=41,72 - 6,283X$, ($R^2=0,45$; $p<0,0001$) para motilidade espermática; $\hat{Y}=3,43 - 0,301X$, ($R^2=0,25$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=3,40 - 0,317X$, ($R^2=0,32$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=3,30 - 0,360X$ ($R^2=0,34$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=3,28 - 0,395X$, ($R^2=0,43$; $p<0,0001$) para vigor espermático e $\hat{Y}=44,17 - 5,250X$, ($R^2=0,49$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=45,19 - 5,373X$, ($R^2=0,54$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=41,76 - 5,443X$, ($R^2=0,50$; $p<0,0001$), $\hat{Y}=41,11 - 5,267X$, ($R^2=0,48$; $p<0,0001$) para o teste supravital. Na tabela 4 estão sumariadas as diferenças entre as avaliações de motilidade espermática, vigor espermático e supravital realizadas no sêmen *in natura* e após o descongelamento, e posteriormente entre as avaliações pós-descongelamento (no teste de termo-resistência).

A motilidade espermática pós-descongelamento demonstrou alta correlação com a porcentagem de espermatozoides vivos pela coloração supravital ($r=0,70$), vigor espermático ($r=0,61$), e valores médios com o teste hiposmótico ($r=0,42$) e com a porcentagem de células íntegras no teste de fluorescência ($r=0,34$). O teste hiposmótico demonstrou baixa correlação ($r=0,26$) com o teste supravital e valores médios ($r=0,36$) com a porcentagem de espermatozoides classificados como íntegros pela avaliação empregando sondas fluorescentes. A morfologia espermática pós-descongelamento não demonstrou correlação ou demonstrou correlação negativa pouco relevante ($r\leq 0,22$) com as características físicas do sêmen e com os testes complementares. As correlações entre os testes realizados pós-descongelamento estão sumariadas na tabela 5.

Tabela 4: Diferenças na motilidade espermática, vigor espermático e supravital de sêmen de suínos realizadas no sêmen *in natura* e pós-descongelamento durante o teste de termo-resistência

TRATAMENTOS	Diferenças entre avaliações				
	<i>In natura</i> / pós-descong.	0-30	30-60	60-90	90-120
Motilidade Espermática					
M3	36,0±10,9 ^B	9,3±4,7 ^a	5,0±4,9 ^a	6,17±5,36 ^a	3,9±5,0 ^a
M10	35,7±9,2 ^B	9,3±6,9 ^a	6,6±6,2 ^a	5,7±4,9 ^a	4,2±4,6 ^a
R3	40,8±11,4 ^{AB}	10,2±5,5 ^a	5,5±5,4 ^a	4,3±4,5 ^a	4,8±5,8 ^a
R10	42,0±11,6 ^A	10,3±5,71 ^a	7,2±5,3 ^a	5,0±5,3 ^a	2,8±3,1 ^a
Média	38,6±10,9	9,8±5,7	6,1±5,6	5,3±5,0	3,9±4,7
Vigor espermático					
M3	0,7±0,6 ^a	0,3±0,4 ^a	0,2±0,3 ^a	0,4±0,4 ^a	0,4±0,5 ^a
M10	0,7±0,5 ^a	0,3±0,3 ^a	0,4±0,6 ^a	0,2±0,3 ^a	0,4±0,5 ^a
R3	0,8±0,6 ^a	0,4±0,4 ^a	0,3±0,4 ^a	0,3±0,4 ^a	0,5±0,5 ^a
R10	0,8±0,5 ^a	0,4±0,4 ^a	0,5±0,5 ^a	0,3±0,3 ^a	0,5±0,4 ^a
Média	0,8±0,6	0,3±0,4	0,3±0,5	0,3±0,4	0,5±0,5
Supra vital					
M3		6,9±5,3 ^a	5,3±4,0 ^a	5,2±3,9 ^{a*}	3,5±3,5 ^a
M10		5,8±5,3 ^a	5,3±3,7 ^a	6,3±5,4 ^{a*}	3,7±3,7 ^a
R3		7,2±5,3 ^a	5,6±4,9 ^a	4,0±3,0 ^{a*}	5,5±4,5 ^a
R10		6,0±5,0 ^a	6,6±4,4 ^a	3,7±3,0 ^{a*}	5,0±4,9 ^a
Média		6,5±5,2	5,7±4,2	4,8±4,0	4,4±4,2

^{A,B}Médias de valores na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferem entre si(p<0,05) pelo teste de Duncan; ^{A,B}Médias de valores na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferem entre si(p<0,05) pelo teste de *Kruskal Wallis; Média±dp = Média e desvio padrão; M3=curva de congelamento controlada por máquina e centrifugação com 2400 G por três minutos; M10=curva de congelamento controlada por máquina e centrifugação com 800 G por 10 minutos; R3= curva de congelamento tradicional com rampa e centrifugação com 2400 G por três minutos;R10= curva de congelamento tradicional com rampa e centrifugação com 800 G por 10minutos; In natura/pós-descong.= diferença entre avaliações do sêmen in natura e do sêmen após o descongelamento; 0-30= diferença entre as avaliações no descongelamento e após 30 minutos de teste de termo-resistência; 30-60= diferença entre as avaliações com 30 minutos e 60 minutos de teste de termo-resistência; 60-90= diferença entre as

avaliações com 60 minutos e 90 minutos de teste de termo-resistência; 90-120= diferença entre as avaliações com 90 minutos e 120 minutos de teste de termo-resistência.

Tabela 5: Correlações Simples de Pearson entre as características físicas e morfológicas do sêmen e testes complementares em suínos da raça Piau.

	MOT	VIG	SV	HOST	INT	SEML	INTSEML	LES	NEL	EL	DEFM	DEFM E	DEFT
MOT	1	0,61	0,70	0,42	0,34	0,20	0,37	-0,37	NS	NS	NS	-0,21	-0,22
VIG		1	0,41	0,22	NS	NS	0,15	-0,15	NS	NS	NS	NS	NS
SV			1	0,26	0,19	0,20	0,24	-0,24	NS	NS	NS	NS	NS
HOST				1	0,36	NS	0,35	-0,35	-0,27	-0,27	NS	-0,19	-0,16
INT					1	NS	0,94	-0,94	NS	NS	NS	-0,20	-0,15
SEML						1	0,46	-0,46	0,31	-0,31	NS	NS	NS
INTSEML							1	-1,00	-0,22	-0,22	NS	-0,15	NS
LES								1	-0,22	-0,22	NS	-0,15	NS
NEL									1	1	NS	NS	NS
EL										1	NS	NS	NS
DEFM											1	0,22	0,69
DEFME												1	0,86
DEFT													1

MOT= motilidade espermática pós-descongelamento; VIG= vigor espermático pós-descongelamento; SV=supravital; HOST=teste hiposmótico; INT=espermatozóides classificados como íntegros pela avaliação por sondas fluorescentes; SEMIL= espermatozóides classificados como semilesados pela avaliação por sondas fluorescentes; INTSEML= espermatozóides classificados como íntegros somados aos espermatozóides classificados como semilesados pela avaliação por sondas fluorescentes; LES= espermatozóides classificados como lesados pela avaliação por sondas fluorescentes; NEL= número de espermatozóides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha; EL= espermatozóides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha; DEFM= defeitos espermáticos classificados como maiores; DEFME= defeitos espermáticos classificados como menores; DEFT= defeitos espermáticos totais.

DISCUSSÃO

Os resultados de motilidade espermática pós-descongelamento obtidos neste estudo são similares aos obtidos em diversos estudos (Ohata *et al.*, 2005; Bianchi *et al.*, 2008; Bianch *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2012).

Em suínos híbridos, Ohata *et al.* (2005) registraram valores médios de 51,4±9,5 para motilidade espermática pós-descongelamento. Bianch *et al.* (2008) compararam os

métodos de Westendorf *et al.* (1975) e Paquignon *et al.* (1976) obtendo valores de $43\pm 1,7$ e $34,3\pm 1,4$ respectivamente. Nesse mesmo estudo, os autores utilizaram diferentes meios diluidores para o resfriamento até 15°C e obtiveram valores de motilidade pós-descongelamento de $43\pm 1,7$; $34\pm 1,7$ e $33\pm 1,7$ respectivamente para os meios BTS, PIGPEL5 e PIGPEL5+LDL. Em suínos da raça Piau, Barros *et al.* (2012) obtiveram valores médios de motilidade espermática ($49,5\pm 12,1\%$), coloração supravital ($39,9\pm 10,4\%$) e hiposmótico ($18,8\pm 5,7\%$) sendo semelhantes, em relação ao sêmen pós-descongelamento, tomando-se como base os resultados dos tratamentos mais eficazes destes autores e do presente estudo (tabela 1).

O R3 apresentou menor percentual de células íntegras na avaliação por sondas fluorescentes em relação a M10 e R10. A diferença entre R3 e M10 possivelmente é atribuída à curva de congelamento de M10, que foi realizada de forma controlada, causando menos injúrias aos espermatozóides. A diferença entre R3 e R10 contraria a hipótese de que a centrifugação com tempo mais curto obtivesse resultados superiores à centrifugação com tempo mais longo, no caso que R3 obtivesse melhores resultados que R10.

Essa diferença pode ter ocorrido devido à maior manipulação dos espermatozóides em R3, já que nos tratamentos em que foi utilizada a rampa, houve maior influência de manipulação humana em relação aos tratamentos que utilizaram a máquina de congelamento. Essa foi a única diferença verificada entre os valores médios nos diferentes tratamentos na avaliação imediatamente após o descongelamento. Adicionalmente, a avaliação da viabilidade espermática deve ser interpretada como um conjunto de todas as avaliações realizadas. Segundo Bernardi (2008) dificilmente um único teste apresenta acurácia para estimar o potencial de fertilidade, visto que não mede todos os atributos qualitativos e funcionais necessários para a fecundação e desenvolvimento embrionário normal que ocorrem *in vivo*.

Em relação ao teste de termo-resistência, no presente estudo, o tempo de incubação de 60 minutos mostrou eficaz em avaliar as diferentes amostras de sêmen, independente da motilidade e vigor apresentado. Porém, após os 90 minutos, todas as partidas apresentaram valores inferiores ao preconizado para uso em programa de Inseminação Artificial (CBRA, 1998), sem demonstrar alteração em seus valores até o final do teste.

A motilidade espermática apresentou alta correlação com o teste supravital, correlação média com HOST e baixa com os testes com sondas fluorescentes no presente estudo. Tais resultados indicam que a motilidade espermática por ser um exame simples,

embora subjetivo (avaliação convencional), rápido, de baixo custo, ou mesmo quando realizado por CASA (Análise de sêmen computadorizada) é um bom indicador da integridade e funcionalidade das membranas, sendo ainda o principal parâmetro utilizado para selecionar os ejaculados (Gadea, 2005).

O teste hiposmótico apresentou baixa correlação com o teste supravital e média correlação com a porcentagem de espermatozóide classificados como íntegros pelas sondas fluorescentes. Esse teste deve ser utilizado em conjunto com outros testes de integridade de membrana, sendo uma importante análise complementar na detecção de alterações na membrana plasmática em espermatozoides suínos, visto que, alguns espermatozoides são considerados com a membrana íntegra na coloração supravital e não mantêm a atividade bioquímica da membrana plasmática ao serem incubados em solução hiposmótica ou na avaliação por sondas fluorescentes (Vazquez *et al.*, 1997).

Embora trabalhos atuais preconizem o teste de ligação à membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha como alternativa para prever o potencial fecundante do sêmen (Barbato *et al.*, 1998; Corcini *et al.*, 2008), essa variável (ligação dos espermatozoides à membrana perivitelínica) apresentou coeficiente de variação muito alto, retratando ser muito instável, o que contribuiu para que não houvesse diferença entre os tratamentos. Essa técnica ainda necessita de ajustes para auxiliar na predição da qualidade seminal. Tais observações são constatadas também pelas baixas ou nulas correlações deste teste com o aspecto físico e os demais testes complementares empregados nesse estudo (tabela 5).

Quanto às correlações dos testes complementares empregados para avaliar a qualidade espermática, os resultados têm sido controversos, sendo que, em poucos estudos foram registrados valores altos de correlação entre as características seminais ou respostas espermáticas funcionais e a fertilidade *in vivo*. Portanto, a análise associada de diferentes testes referentes à qualidade seminal proporciona melhor acurácia em prever a fertilidade dos espermatozoides.

No presente estudo, a centrifugação de 2400 G por três minutos apresentou-se superior em relação à centrifugação de 800 G por dez minutos na avaliação de integridade de membrana avaliada por sondas fluorescentes. Esse resultado corrobora com Carvajal *et al.* (2004) que avaliaram regimes de centrifugação de 2400 G por três minutos, 1600 G por cinco minutos e 800 G por dez minutos, e obtiveram melhores resultados pós-descongelamento de motilidade espermática, percentual de espermatozoides com acrossoma intacto em relação à população espermática inicial e percentual de espermatozoides não capacitados nos regimes de 2400 G por três minutos e de 1600 G por

cinco minutos, sendo ainda constatada maior capacidade de penetração em ovócito pós-descongelamento no regime de 2400 G por três minutos. O tempo de centrifugação parece ser mais crítico do que a força de rotação, concordando com Shekarriz *et al.* (1995) que estudando o sêmen humano concluiu que um tempo curto de centrifugação é mais adequado para manutenção da qualidade seminal.

As injúrias causadas pela centrifugação são atribuídas ao trauma mecânico nas membranas dos espermatozóides (Alvarez *et al.*, 1993) e indiretamente aos danos provocados pela formação excessiva de ROS (espécies reativas de oxigênio) (Aitken e Clarkson, 1988; Mortimer, 1991). Altas concentrações de ROS estão associadas aos danos de membrana espermática por meio da peroxidação lipídica, o qual pode alterar a função espermática, levando à perda de motilidade e viabilidade espermática e conseqüentemente reduzir a fertilidade (Shekarriz *et al.*, 1995). Quanto mais intensa e longa a peletização, maior produção de ROS e mais danos aos espermatozóides (Katkov e Mazur, 1998), sendo que a exposição intensa aos ROS tem maior influencia nos danos celulares quando comparada às altas acelerações na centrifugação. O regime de 2400 G por três minutos apresentou melhores resultados possivelmente devido à menor estimulo de produção de ROS, quando comparado ao regime de 800 G por dez minutos.

No processo de criopreservação sob a temperatura de 5°C, a água intra e extracelular permanecem super refrigerada e não cristaliza. No entanto, entre as temperaturas de -5 e -10 °C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece super refrigerado e hipertônico, ocorrendo troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular (Medeiros, 2002). O espermatozóide suíno é severamente danificado pelo super resfriamento e é de fundamental importância que a curva de congelamento seja bem controlada depois da nucleação do gelo; uma curva de congelamento com taxas lentas imediatamente após a nucleação e taxas mais rápidas nas temperaturas mais intensas abaixo de zero resulta em melhores resultados. Tais observações são corroboradas pelos estudos Woelders *et al.* (2005) que empregando um modelo matemático que simula os eventos osmóticos durante o congelamento, verificaram a importância da variação das taxas de congelamento em função da temperatura. No presente estudo, observou-se que a curva com temperatura controlada por máquina programada de acordo com as exigências de cada faixa de temperatura apresentou melhores resultados quando comparada à curva tradicional (com controle de queda de temperatura menos precisa), provavelmente devido

ao menor estresse osmótico e à menor quantidade de gelo intra e extracelular formado durante o congelamento.

CONCLUSÕES

No presente estudo foi observado que tanto a curva de congelamento quanto o regime de centrifugação influenciam na qualidade espermática pós-descongelamento, sendo que centrifugações com tempos mais curtos e curvas de congelamento com queda de temperatura controlada por máquina são as mais indicadas para minimizar as injúrias espermáticas. Os protocolos propostos nos diferentes tratamentos apresentaram qualidade seminal pós-descongelamento satisfatória em testes de avaliações *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez J.G., Lasso J.L., Blasco L., Nunez R.C., Heyner S., Caballero P., Storey B.T. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile life. **Human Reproduction**, v.8, p.1087–1092,1993.

Aitken R.J., Clarkson J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining of the efficiency of sperm preparation technique. **Journal of Andrology**, v.9, p.367–376, 1988.

Barbato G.F., Cramer P.G., Hammerstedt R.H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. **Biology of Reproduction**, v.58, p.686-699, 1998.

Barros M.H.C, Shiomi H.H., Amorim L.S.,Guimarães S.E.F., Lopes P.S., Siqueira J.B, Guimarães, J.D. Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*) submetido a três protocolos de congelamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.4, p.914-922, 2012.

Bernardi M.L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36(Supl 1): s5-s16, 2008.

Bianchi I., Calderam K., Maschio E.F., Madeira E.M.,Ulguim R. da Rosa, Corcini C.D., Bongalhardo D.C.,Correa E.K., Lucia T., Deschamps J.C., Correa, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.69, p.632–638, 2008.

Bianchi I., Madeira E.M., Schneider A., Rabassa V.R., Corrêa E.K., Lucia Jr. T., Corrêa M.N.Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.1, p.949-956, 2011.

Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.389-396, 2004.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal-2ed.** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998, 49p.

Corcini C.D., Stephan M.H.L., Collares E.P., Santos E.C.S., Schiavon R.S., Varela J.A.S, Bongalhardo D.C., Lucia T. Comparação entre o teste de penetração in vitro e o das membranas perivitelina do ovo da galinha para predizer a fertilidade do macho. **Conhecimento sem fronteiras: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro da pós-graduação**, 2008.

Gadea J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444, 2005.

- Garcia S.K., Barbosa A.S. Características etiológicas, biométricas e seminais de varrões da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.279-289, 1994.
- Hancock J.L. The morphology of boar spermatozoa, **Journal of Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.
- Harisson R.A., Vickers S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-52, 1990.
- Holt W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- Holt W.V. Germplasm cryopreservation in elephants and wild ungulates. In: Watson, P.F., Holt, W.V. (Eds.), *Cryobanking the Genetic Resource*, **Wildlife Conservation for the Future**, 1st ed. Taylor&Francis, London, p.318–346, 2001.
- Holt W.V., Medrano A., Thurston L.M., Watson P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v.63 (2), p.370-82, 2005.
- Katkov I.I., Mazur P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, p.232–241, 1998.
- Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.
- Melo M.I.V., Henry M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of invitro fertilization. **Human Reproduction**, v.6, p.173–176, 1991.
- Ohata P.M., Wentz I., Bernardi M.L., Castagna C., Bortolozzo, F.P. Viabilidade do sêmen suíno congelado submetido a um período de equilíbrio pré-congelamento com ou sem a presença de plasma seminal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.29, p.123-129, 2001.
- Ohata P.M., Bernardi M.L., Reis G.R., Bortolozzo F.P., Wentz I. Freezability of swine semen according to equilibration time and chilling sensitivity. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.69-74, 2005.
- Paquignon M., Courot M. Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. **8th International Congress on Animal Reproductive Artificial Insemination**, Cracow-Poland, v.4, p.1041–1044, 1976.
- Paulenz H., Taugbol O., Kommisrud E., Grevle I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v.34, p.431-435, 1999.

Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vazquez J.M., Martinez E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, p.84, p.2692–2699, 2006.

Roca J., Hernández M., Carvajal G. *et al.* Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2692-2699, 2010.

Shekarriz M., De Wire D.M., Thomas A.J. Jr, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**, v.28, p.31–35, 1995.

Sollero B.P., Paiva S.R., Faria D.A, Guimarães S.E.F, Castro S.T.R., Egito A.A., Albuquerque M.S.M., Piovezan U., Bertani G.R., Mariante A.S. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v.123 (1), p.8-15, 2009.

Vazquez J.M., Martinez E.A., Martinez P., Garcia-Artiga C., Roca J. Hipoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.

Woelders H., Matthus A., Den Besten M. Boar variation in “freezability” of the semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.1, p.153-159, 1996.

Woelders H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v.19, n.3, p.135-138, 1997.

Woelders H., Matthijs A., Zuidberg C.A., Chaveiro A.E.N. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. **Theriogenology**, v.63, p.383–395, 2005.