



Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau submetido a três protocolos de congelamento¹

Maurício Hoshino da Costa Barros², Hugo Hideki Shiomi³, Lincoln da Silva Amorim³,
Simone Eliza Facioni Guimarães⁴, Paulo Sávio Lopes⁴, Jeanne Broch Siqueira⁴,
José Domingos Guimarães³

¹ Projeto financiado pela FAPEMIG.

² Empresa Perdigão, Videira/SC.

³ Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

⁴ Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

RESUMO - Objetivou-se verificar o efeito de três protocolos de criopreservação sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*), por meio de testes de avaliação *in vitro* e *in vivo*. Foram coletados 22 ejaculados de 5 machos adultos da raça Piau por meio do método da mão enluvada. Para verificar a viabilidade espermática do sêmen *in natura* e pós-descongelamento, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático, o teste hiposmótico, a coloração supra-vital e a porcentagem de acrossomas normais. Para o congelamento, os ejaculados foram fracionados e submetidos em: protocolo 1, método de congelamento preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto aos meios diluentes; protocolo 2, método preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto à curva de resfriamento; e protocolo 3, método preconizado por Ohata et al. (2001). Para testar a fertilidade *in vivo* do sêmen congelado/descongelado, foram realizadas 23 inseminações intrauterinas (pós-cervicais) em 14 fêmeas da raça Piau com o sêmen proveniente do protocolo 3. Os valores médios obtidos com o uso dos protocolos 1 e 2 pós-descongelamento foram inferiores aos obtidos com o protocolo 3. Quatro porcas adultas ficaram gestantes (28,6% de taxa de fertilidade). O protocolo de congelamento preconizado por Ohata et al. (2001), com período de equilíbrio de 90 minutos a 22-26 °C, permite obter melhores resultados de viabilidade espermática *in vitro* em comparação aos outros dois protocolos. A ausência de período de equilíbrio do protocolo 1 e a curva de resfriamento utilizada no protocolo 2 afetam negativamente os parâmetros de viabilidade espermática avaliados no presente estudo. Apesar dos resultados satisfatórios *in vitro* para o congelamento de sêmen com a utilização do protocolo 3, o mesmo apresenta baixa taxa de fertilidade (28,6%).

Palavras-chave: espermatozoides, inseminação intra-uterina, varrões

Semen cryopreservation of Piau swine breed submitted to three freezing protocols

ABSTRACT - The objective of this study was to verify the effect of three protocols of cryopreservation on the sperm viability post-thawing of swine from the Piau breed (*Sus scrofa*), by means of evaluation assays *in vitro* and *in vivo*. Twenty-two ejaculates of 5 adult males of the Piau breed through the gloved-hand method. In order to verify the sperm viability of the raw semen and post-thawing, the following traits were evaluated: sperm motility and vigor, hypoosmotic test, supra-vital color test and percentage of normal acrosomes. To freezing, the ejaculates were fractioned and submitted in: method 1, method of freezing recommended by Fürst et al. (2005), modified according to media extender; method 2, recommended by Fürst et al. (2005), modified according to the cooling curve; and method 3, recommended by Ohata et al. (2001). To test the *in vivo* fertility of the frozen/thawed semen, 23 intra-uterine (post-cervical) inseminations were performed in 14 females of the Piau breed, with semen from method 3. The mean values obtained with the use of methods 1 and 2 and post-thawing were inferior to those obtained with method 3. Four adult sows got pregnant (28.6% fertility rate). The freezing method recommended by Ohata et al. (2001), with balance period of 90 minutes at 22-26 °C, enables higher results of *in vitro* sperm viability in comparison with the two other methods. The absence of balance period of method 1 and the cooling curve utilized in protocol 2 affect negatively the parameters of sperm viability evaluated in the present study. In spite of the satisfactory results *in vitro* for the freezing of semen with the utilization of method 3, it presents low fertility rate (28.6%).

Key Words: boars, intra-uterine insemination, spermatozoa

Introdução

As pesquisas sobre criopreservação de sêmen desenvolvidas nos últimos 30 anos resultaram em avanços originados de estudos sobre a avaliação de diferentes crioprotetores, embalagens de congelamento, diluentes e curvas de congelamento e descongelamento (Antunes, 2007). No entanto, o emprego de sêmen congelado ainda apresenta índices reprodutivos insatisfatórios e está associado à redução de menos 10 a 20% na taxa de parto e de 1 a 2 leitões por leitegada (Johnson, 1998) em relação aos obtidos com o uso de sêmen resfriado (Almlid & Hofmo, 1996; Mileham et al., 1997; Woelders, 1997).

Estima-se que sejam realizadas em torno de 19 milhões de inseminações artificiais no mundo, sendo que destas menos de 1% envolve o uso de sêmen congelado (Johnson et al., 2000). Apesar de os dados atuais de produtividade com sêmen congelado serem desanimadores em rebanhos comerciais, pesquisadores apontam para um futuro promissor com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelamento de sêmen (Wolders & Ten Napel, 2005).

A preservação e o aumento genético de raças de suínos em extinção (Pereira, 2004), entre as quais as raças suínas nativas brasileira, a raça Piau (*Sus scrofa*) é considerada a melhor e mais importante raça naturalizada nacional (Cavalcanti, 1984), sendo a única raça nativa que ainda existe no País.

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. Desta forma, objetivou-se verificar o efeito de três protocolos de criopreservação de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*), por meio de testes de avaliação *in vitro* e *in vivo*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Granja de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa no período de março de 2008 a março de 2009. Foram utilizados 22 ejaculados de cinco varrões da raça Piau com 1 a 2 anos de idade.

As coletas de sêmen foram realizadas semanalmente utilizando-se o método da estimulação com a mão enluvada (Hancock & Hovell, 1959), com auxílio de um manequim móvel ou uma fêmea em estro. O ejaculado total foi coletado

em copos plásticos descartáveis de 700 mL, esterilizados, protegidos em embalagens térmicas previamente aquecidas a 37 °C, com dupla camada de gases fixados com barbante sobre a parte aberta do copo, para reter a fração gelatinosa do sêmen. O sêmen colhido foi mantido em banho-maria, a 32 °C, para avaliação das análises laboratoriais de motilidade, vigor espermático, teste hiposmótico, coloração supravital e porcentagem de acrossomas normais.

A porcentagem de motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático (escala de 0 a 5) foram realizadas acondicionando uma alíquota de 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. A motilidade espermática foi determinada pela atividade de movimento total dos espermatozoides e o vigor espermático caracterizado pela intensidade de movimento ou de batimento da cauda dos espermatozoides.

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para isso, acrescentou-se uma alíquota de 100 µL de sêmen a 1,0 mL de uma solução de sacarose na concentração de 100 mOsm/L, previamente aquecida a 37 °C, a qual foi incubada por 60 minutos a 37 °C. As amostras foram fixadas em 0,5 mL de solução formol-salina tamponada e, posteriormente, uma alíquota de 20 µL da solução foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 100 espermatozoides, em microscopia de contraste de fase com aumento de 1250x. 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 (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HO) (Melo & Henry, 1999).

A avaliação de células vivas ou mortas foi realizada pelo teste de coloração supravital, utilizando solução de eosina (1%) e nigrosina (5%), conforme descrito por Bamba (1988). Para isso, homogenizou-se uma amostra de 10 µL de sêmen *in natura* com 10 µL de corante, sobre uma lâmina pré-aquecida a 37 °C. Em seguida, confeccionou-se um esfregaço sobre a mesma lâmina, e após 20 a 30 segundos, contabilizou-se o total de 100 células sob microscopia óptica em aumento de 200X. Foram classificadas como células vivas as que permaneceram sem se corar, e as mortas, que se coraram em rosa avermelhado.

A avaliação da integridade do acrossoma foi realizada a partir da mistura de uma alíquota de 100 µL de sêmen *in natura* em 1 mL de solução de formol salina tamponado. Uma amostra de 10 µL de mistura foi acondicionada entre lâmina e lamínula de microscopia e procedeu-se à contagem de 100 células espermáticas em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000X.

Posteriormente, os ejaculados foram fracionados e submetidos aos seguintes protocolos de congelamento: o protocolo 1, que utilizou o método de congelamento preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto aos meios diluentes; o protocolo 2, que utilizou o método preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto à curva de resfriamento; e o protocolo 3, que utilizou o método preconizado por Ohata et al. (2001).

Para o protocolo 1, o ejaculado foi diluído em 1:1 BTS (*Beltsville Thawing Solution*) a 32 °C e imediatamente centrifugado a 800 G por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os espermatozoides no diluente de resfriamento (DR) (80 mL de solução de lactose a 11%; 20 mL de gema de ovo). A concentração de espermatozoides no pélete foi estimada utilizando-se a câmara de Neubauer Improved e, com isso, foi determinado o volume de ressuspensão do diluente de congelamento. Imediatamente após ter sido acrescentado o diluente de congelamento (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), o sêmen foi envasado em palhetas finas (0,25 mL). Na continuidade, utilizou-se uma curva de resfriamento de forma que as palhetas contendo o sêmen na temperatura ambiente foram colocadas em tubo de ensaio com tampa e capacidade de 20 mL. O tubo foi revestido com saco plástico e o conjunto transferido para um recipiente com capacidade de 240 mL (mamadeira plástica) contendo 120 mL de álcool metílico. O recipiente com o sêmen foi colocado na posição horizontal, em geladeira, com temperatura interna de 4-5 °C por 35 minutos. Após esse tempo, o tubo de ensaio foi retirado do recipiente plástico e mantido na geladeira por mais 25 minutos. Para o congelamento do sêmen, as palhetas foram colocadas, na posição horizontal, sobre uma raque a 4 cm acima do nitrogênio líquido e mantidas em vapor de nitrogênio (-120 °C) por 15 minutos e, finalmente, submersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Os procedimentos envolvidos no protocolo 2 foram semelhantes aos do protocolo 1, com uma modificação apenas: foi adotado um período curto de 90 minutos de equilíbrio imediatamente após a diluição inicial do sêmen com o BTS, para estabilização a 22-26 °C, antes da centrifugação, com o intuito de aumentar a viabilidade espermática pós-descongelamento.

No protocolo 3, o ejaculado foi diluído em 1:1 em BTS a 32 °C e mantido à temperatura ambiente de 22 a 26 °C por 90 minutos. Em seguida, foi resfriado a 15 °C por 150 minutos e, ao final deste período, foi centrifugado a 800 G por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os espermatozoides com DR (80 mL

de solução de lactose a 11%; 20 mL de gema de ovo). A concentração de espermatozoides no pélete foi estimada utilizando a câmara de Neubauer Improved e, com isso, foi determinado o volume de ressuspensão do DR. O pélete ressuspendido foi mantido a 5 °C por 90 minutos e, após esse período, foi adicionado o DC (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) até atingir uma concentração final de 800×10^6 espermatozoides/mL ou 200×10^6 /palheta, de modo que a quantidade de diluente de congelamento fosse equivalente a um terço do volume de sêmen anteriormente diluído com o DR, para então obter-se uma concentração final de 2% de glicerol. Imediatamente após ter sido acrescentado o diluente de congelamento, foi realizado o envase em palhetas finas (0,25 mL), as quais foram mantidas em vapor de nitrogênio (-120 °C) por 15 minutos e, posteriormente submersas em nitrogênio líquido a -196 °C.

O descongelamento do sêmen foi realizado da mesma maneira para os três protocolos de congelamento, por meio da agitação da palheta com uma pinça, em banho-maria a 37 °C, por 20 segundos (Maxwell & Johnson, 1997). Posteriormente, a palheta foi seca com papel-toalha, as extremidades cortadas com uma tesoura e seu conteúdo ressuspendido com 1,25 mL de diluente BTS, a 37 °C. Após o descongelamento, as amostras de sêmen dos três protocolos foram mantidas a 37 °C e avaliadas quanto aos parâmetros motilidade, vigor, teste hiposmótico, coloração supravital e porcentagem de acrossomas normais da mesma maneira que o sêmen *in natura*.

Para testar a fertilidade *in vivo* do sêmen congelado/descongelado, foram realizadas 23 inseminações intrauterinas (pós-cervicais) em 14 fêmeas da raça Piau (5 leitoas e 9 porcas) disponíveis para acasalamento, com sêmen congelado obtido pelo protocolo 3, de acordo com o programa de melhoramento genético da granja. Foram conduzidas duas inseminações por fêmea: nas leitoas, a primeira inseminação foi realizada no momento da detecção do estro e a segunda, 12 horas após a primeira; enquanto nas porcas, a primeira inseminação foi realizada 12 horas após a detecção do estro e a segunda, 24 horas após a primeira. A dose inseminante consistiu no descongelamento de 3 palhetas de sêmen (200 milhões de espermatozoides/palheta), totalizando 600 milhões de espermatozoides total, que foram diluídos em 50 mL de BTS, constituindo uma concentração suficiente para fertilização devido aos fatores compensadores do sêmen.

A análise estatística foi realizada pelo programa estatístico SAEG (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas, versão 9.1). Estatística descritiva (média, desvio-padrão) foi utilizada para todas as características estudadas

(motilidade, vigor, teste hiposmótico, coloração supravital e porcentagem de acrossomas normais). Os dados referentes às avaliações físicas e morfológicas do sêmen e testes complementares foram submetidos aos testes de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Os dados quantitativos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), verificando o efeito de machos e protocolos, e quando houve significância pelo teste “F”, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. Parâmetros que não atenderam às premissas da ANOVA foram avaliados por análise não-paramétrica, com comparação de médias pelo teste de Kruskal Wallis. Para verificar a relação entre os dados estudados, foi efetuada análise de correlação simples de Pearson.

Resultados e Discussão

Os valores de viabilidade espermática do sêmen pós-coleta antes da diluição (sêmen *in natura*) (Tabela 1) foram semelhantes aos registrados por Bianchi et al. (2008) para motilidade espermática e superiores ao resultado do teste hiposmótico registrados pelos mesmos autores (85 e 35%, respectivamente). Ohata et al. (2005) registraram valores superiores para motilidade espermática do sêmen *in natura* após a diluição com BTS (89,4%), enquanto Roca et al. (2010) registraram valores de 76,3%, quando comparados aos registrados neste estudo. A sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo de congelamento-descongelamento foi evidenciada na comparação dos resultados das avaliações do sêmen *in natura*, com os resultados obtidos após o congelamento nos três protocolos utilizados.

As diferenças existentes no sêmen suíno provocam redução da fertilidade e, segundo Ruvalcaba et al. (2003) podem ser explicadas por mudanças estruturais e funcionais dos espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento. Diferenças na bicamada lipídica da membrana como menor porcentagem de moléculas de

colesterol e sua distribuição de maneira assimétrica na membrana, além de diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios que possuem poucas duplas ligações do tipo *cis*, poderiam explicar a maior susceptibilidade do mesmo ao choque pelo resfriamento (Watson, 1995; Paulenz et al., 1999).

O período de equilíbrio, caracterizado pela redução lenta da temperatura do sêmen suíno, após a coleta e antes de submetê-lo a temperaturas inferiores a 15 °C, tem como objetivo diminuir os efeitos deletérios do choque térmico sobre os espermatozoides, aumentando sua viabilidade após o descongelamento (Ohata et al., 2001). Adicionalmente, no desenvolvimento de protocolos de congelamento de sêmen suíno, tem-se que considerar a interação entre a concentração de crioprotetor utilizado e as velocidades de congelamento/descongelamento, que sabidamente devem ser otimizadas em conjunto (Johnson et al., 2000).

Neste estudo, a ausência de período de equilíbrio do protocolo 1 e a curva de resfriamento utilizada no protocolo 2 podem ter afetado negativamente os parâmetros de viabilidade espermática avaliados.

Com exceção do vigor espermático, todos os parâmetros reduziram ($P<0,05$) após o congelamento do sêmen, em comparação ao sêmen *in natura*, independentemente do protocolo utilizado. Os valores médios de motilidade espermática verificados no protocolo 3 foram maiores ($P<0,05$) que dos outros dois protocolos. Do mesmo modo, a porcentagem média de espermatozoides móveis obtidos no protocolo 2 foi maior ($P<0,05$) que a obtida no protocolo 1. Na comparação das médias de vigor espermático entre os protocolos, verificou-se que os protocolos 2 e 3 foram superiores ($P<0,05$) ao protocolo 1. Nos diferentes protocolos, a porcentagem de espermatozoides vivos verificada por meio da coloração supravital foi maior para o protocolo 3 ($P<0,05$) em comparação aos protocolos 1 e 2.

A análise de integridade de membrana pós-descongelamento, avaliada pelo teste hiposmótico não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os três protocolos de criopreservação utilizados. Os valores médios obtidos com

Tabela 1 - Características espermáticas médias de sêmen de suíno da raça Piau avaliados por meio de testes convencionais e complementares

Parâmetro	Protocolos de congelamento			
	IN	P1	P2	P3
Motilidade espermática (%)	83,4±5,4a	20,9±12,4b	29,5±10,9c	49,5±12,1d
Vigor espermático (0-5)	3,3±0,5a	2,5±0,5b	2,9±0,4a	3,4±0,4a
Coloração supravital (% vivos)	82,6±7,1a	14,8±12,0b	20,4±7,2b	39,9±10,4c
Teste hiposmótico (% reativos)	88,0±5,5a	17,8±8,1b	17,9±9,1b	18,8±5,7b
Acrossomas normais (%)	95,9±2,7a	14,8±10,3b	18,4±8,1b	44,6±14,4c

IN = sêmen *in natura*; P1 = protocolo preconizado por Fürst (2005) modificado quanto aos meios diluentes; P2 = protocolo 1 modificado quanto à curva de resfriamento; P3 = protocolo preconizado por Ohata et al. (2001).

a,b,c,d - Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha apresentam diferença ($P<0,05$) pelo teste Tukey.

o uso do protocolo 3 (Tabela 1), com exceção do teste hiposmótico, comprovaram superioridade do mesmo na criopreservação das células espermáticas dos animais deste estudo (Tabela 1), estando os mesmos dentro das variações observadas por outros autores no congelamento de sêmen suíno (Berger & Fischerleitner, 1992; Ortman & Rodriguez-Martinez, 1994; Bianchi et al., 2011), fato que comprova que o método de congelamento preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto aos meios diluentes (P1) e modificado quanto à curva de resfriamento (P2), realizada em equinos, não foi eficaz para o congelamento de sêmen de suíno, provavelmente pelas diferentes características estruturais e funcionais do espermatozoide em relação ao espermatozoide de equinos.

No entanto, resultados próximos, embora superiores ao deste estudo foram registrados por Ohata et al. (2001), Ohata et al. (2005) e Bianchi et al. (2008). Ohata et al. (2001), em pesquisa com animais híbridos (cruzamento de Landrace, Large-white e Pietran), registraram valores de 60,2 e 67,8% para motilidade espermática e acrossomas normais pós-descongelamento utilizando o mesmo protocolo de congelamento e tempo de equilíbrio (90 minutos) do protocolo 3 deste estudo. Quando aumentaram o tempo de equilíbrio de 90 minutos para 20 horas, os autores registraram valores de 53,3 e 71,5% para motilidade espermática e porcentagem de acrossomas normais pós-descongelamento. Kotzias-Bandeira (1997), utilizando envase em macrotubos, verificou superioridade de 13% na motilidade e de 8% nos acrossomas normais, após o descongelamento, quando o tempo de equilíbrio a 20 °C passou de 1 hora e 30 minutos para 20 horas. Ohata et al. (2005) registraram valores médios de 51,4 e 60,5% após o descongelamento para motilidade espermática e porcentagem de acrossomas normais em protocolo utilizando tempo de equilíbrio de 90 minutos, e de 51,4±9,9 e 69,9±13,7% para o período longo de incubação de 20 horas, demonstrando que o pré-congelamento por 20 horas confere maior estabilidade ao acrossomo após o descongelamento, diminuindo os efeitos deletérios do choque térmico sobre os espermatozoides. Neste estudo, o tempo de equilíbrio de 90 minutos associado às características do sêmen da raça Piau podem ter interferido nos resultados mais baixos se comparados aos da literatura.

Bianchi et al. (2008), utilizando sêmen de machos cruzados (Landrace e Large white), registraram valores de 53,45 e 26% e 65,53 e 28% para motilidade espermática, teste de fluorescência e teste hiposmótico, respectivamente, quanto utilizaram o glicerol a 3% e a dimetilacetamida a 5% como crioprotetores ($P>0,05$). Embora esses autores tenham utilizado o mesmo protocolo de congelamento do protocolo

3 deste estudo, a concentração de crioprotetor foi maior (3% de glicerol versus 2%), o que pode ter contribuído para melhores resultados em relação à integridade funcional e estrutural da membrana plasmática durante o processo de congelamento.

Na comparação entre os protocolos 1 e 2, verificou-se que a aplicação de um período de equilíbrio de 90 minutos antes da etapa de centrifugação do protocolo 1 melhorou a motilidade e o vigor espermáticos ($P<0,05$). Segundo Pursel & Park (1985), a redução lenta da temperatura do sêmen suíno após a coleta e antes de submetê-lo a temperaturas inferiores a 15 °C (tempo de equilíbrio) é necessária antes de submeter os espermatozoides ao congelamento, de modo a diminuir os efeitos deletérios do choque térmico sobre os espermatozoides, aumentando sua viabilidade após o descongelamento. Apesar de os protocolos 2 e 3 terem utilizado o mesmo tempo de equilíbrio (90 minutos), o protocolo 3 apresentou melhores resultados de viabilidade espermática pós-descongelamento, sugerindo que a curva de resfriamento utilizada de acordo com metodologia preconizada por Fürst et al. (2005), em sêmen se equinos, não foi eficaz para o congelamento de sêmen de suínos.

Ao analisar a influência do tempo de equilíbrio a 18 °C sobre a motilidade pós-descongelamento, Kotzias-Bandeira (1997) verificou um aumento significativo de 13% quando o tempo de equilíbrio passou de 1,5 hora para 20 horas. Contrariamente, Ohata et al. (2001) observaram que o tempo de equilíbrio não influenciou a motilidade e porcentagem de acrossomas normais. A redução da viabilidade espermática, expressa no estudo de Ohata et al. (2001) pela redução da integridade das membranas e da motilidade, pode ter sido causada pelo fato de que o sêmen diluído foi exposto a temperaturas entre 22-26 °C, acima dos 18 °C (Kotzias-Bandeira, 1997) e 17 °C (Eriksson & Rodrigues-Martínez, 2000) utilizados em outros estudos. Segundo os autores, é possível que a temperatura elevada e o longo tempo de exposição durante o período de equilíbrio tenham sido prejudiciais aos espermatozoides devido a alterações metabólicas ou mesmo a alterações nas características das membranas espermáticas. Este fato não foi verificado neste estudo, visto que não foi realizado tempo de equilíbrio maior que 90 minutos nos protocolos utilizados.

Ohata et al. (2005) não observaram diferença entre os períodos de equilíbrio quanto à motilidade espermática ($P>0,05$), porém verificaram superioridade quanto ao percentual de acrossomas normais após o descongelamento nas amostras submetidas a 20 horas de equilíbrio, o que torna possível enviar as amostras de sêmen para que sejam processadas e utilizadas em locais diferentes dos da coleta,

visto que o tempo de 20 horas do período de equilíbrio permite que o sêmen seja transportado, se necessário.

Para a metodologia de criopreservação de sêmen empregada neste estudo, independentemente do protocolo, foram observadas correlações ($P < 0,05$) entre quase todos os parâmetros espermáticos *in vitro* utilizados para avaliação do sêmen congelado/descongelado, com exceção do teste hiposmótico (Tabela 2), corroborando estudo de Flores et al. (2009) com sêmen suíno congelado. Apesar de estes autores não terem feito análises de correlações entre as variáveis, em seu estudo, as quedas na viabilidade espermática pelo teste eosina-nigrosina e acrossomas intactos decorrentes de diferentes grupos experimentais (animais foram separados de acordo com melhor ou pior congelabilidade) foram proporcionalmente acompanhadas da queda na motilidade espermática.

Embora o foco de avaliação dos testes hiposmótico e supravital ser a membrana plasmática dos espermatozoides, não foi registrada correlação entre os dois testes neste estudo, assim como observado por Oliveira (2007). Entretanto, em estudo de avaliação de sêmen equino, conduzido por Melo & Henry (1999), foram registradas correlações de 0,70 entre os dois testes supracitados, além de correlações significativas entre cada um dos testes com parâmetros físicos do sêmen (Supravital \times Parâmetros físicos = 0,75; Hiposmótico \times Parâmetros físicos = 0,68).

A ausência de correlações entre o teste hiposmótico e os outros parâmetros avaliados neste estudo se deve,

provavelmente, às diferenças de propriedades dos testes e avaliações empregadas. De acordo com Vazquez et al. (1997), o teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática (baseada em propriedades osmóticas da membrana plasmática), enquanto as colorações supravitais mostram a integridade estrutural da membrana espermática, com base em permeabilidade das grandes moléculas dos corantes. Os autores enfatizaram ainda que espermatozoides “vivos” (não corados) podem ter a membrana não funcional e serem incapazes de reagir à exposição hiposmótica, ainda que estruturalmente intactas.

A ausência de correlações entre o teste hiposmótico e a integridade de acrossoma pode ser explicada por estudos realizados por Pérez-Llano et al. (2003), que, avaliando os dois parâmetros em sêmen suíno *in natura* e resfriado (15 °C), identificaram subpopulações de espermatozoides com membrana plasmática funcional na cauda, mas com acrossoma danificado, e subpopulações de espermatozoides com acrossoma intacto, mas com membrana plasmática não funcional na cauda, sugerindo independência da membrana plasmática que envolve a cauda e acrossoma. Segundo esses autores, é essa diferença que permite respostas diferentes e não-sincronizadas às condições externas a que os espermatozoides são submetidos, estando, portanto, sujeitas a não apresentar correlação estatisticamente detectável.

Contudo, é importante ressaltar que esses trabalhos citados foram conduzidos com sêmen suíno *in natura* ou

Tabela 2 - Correlações simples de Pearson entre os parâmetros espermáticos do sêmen congelado/descongelado (D) e *in natura* (IN)

	MOTD	VIGD	SUPD	HIPD	ACRD	MOTIN	VIGIN	SUPIN	HIPIN	ACRIN
Protocolo 1										
MOTD	1	0,82	0,87	NS	0,66	NS	NS	NS	NS	NS
VIGD		1	0,56	NS	0,42	NS	NS	NS	NS	NS
SUPD			1	NS	0,79	NS	NS	0,30	NS	NS
HIPD				1	NS	-0,38	NS	-0,51	NS	NS
ACRD					1	NS	NS	NS	NS	NS
Protocolo 2										
MOTD	1	0,78	0,54	NS	0,54	NS	NS	NS	NS	0,40
VIGD		1	0,53	NS	0,46	NS	NS	NS	NS	0,37
SUPD			1	NS	0,70	NS	NS	NS	NS	0,30
HIPD				1	NS	NS	NS	-0,37	-0,40	NS
ACRD					1	NS	NS	NS	NS	NS
Protocolo 3										
MOTD	1	0,76	0,65	NS	0,61	0,36	NS	0,51	0,33	0,33
VIGD		1	0,52	NS	0,47	NS	NS	NS	NS	NS
SUPD			1	NS	0,74	NS	NS	0,33	0,49	NS
HIPD				1	NS	NS	NS	-0,37	NS	NS
ACRD					1	0,43	NS	0,37	0,55	0,43

MOTD = motilidade espermática do sêmen congelado/descongelado; VIGD = vigor espermático do sêmen congelado/descongelado; SUPD = coloração supravital do sêmen congelado/descongelado; HIPD = teste hiposmótico do sêmen congelado/descongelado; ACRD = % de acrossomas normais do sêmen congelado/descongelado; MOTIN = motilidade espermática do sêmen *in natura*; VIGIN = vigor espermático do sêmen *in natura*; SUPIN = coloração supravital do sêmen *in natura*; HIPIN = teste hiposmótico do sêmen *in natura*; ACRIN = % de acrossomas normais do sêmen *in natura*. NS = não-significativo, $P > 0,05$.

resfriado, não criopreservado. Considerando os resultados (Tabela 1), presume-se que o protocolo empregado para a execução do teste hiposmótico neste estudo (100mOsm/L x 60 minutos x 37 °C) não foi adequado para avaliar a funcionalidade da membrana espermática do sêmen pós-descongelamento, visto que as médias de espermatozoides reativos ao teste para os três protocolos foram praticamente idênticas, enquanto os resultados dos outros parâmetros demonstram que existem diferenças entre a viabilidade espermática entre os protocolos.

Ao considerar o efeito dos machos na qualidade espermática pós-descongelamento, foi constatada uma variação significativa entre os mesmos em alguns parâmetros espermáticos estudados (Tabela 3). Para as demais análises realizadas, não foi verificada diferença nos valores médios registrados. Ohata et al. (2001) registraram variação significativa entre os machos, mas não observaram efeito na interação macho e protocolos de congelamento.

Em estudos com suínos, alguns autores (Johnson et al., 1981; Almlid & Hofmo, 1996; Woelders et al., 1996) citam que diferenças raciais influenciam na congelabilidade do sêmen. Adicionalmente, Ohata et al. (2001) observaram diferenças no sêmen de machos de mesma composição genética, após o descongelamento, de até 18% na porcentagem de acrossomas normais e de 10% na motilidade espermática, fato que indica efeito varrão na congelabilidade de sêmen suíno.

As diferenças entre machos observadas neste estudo quanto à viabilidade espermática após o congelamento corroboram estudos anteriores (Larsson & Einarsson, 1976; Mies Filho et al., 1978; Fiser et al., 1996; Rodriguez-Martinez et al., 1996; Woelders et al., 1996; Roca et al., 2010). A grande variabilidade na resposta dos machos suínos ao congelamento constitui-se numa das diversas limitações ao emprego comercial do sêmen congelado na suinocultura moderna (Bortolozzo et al., 2005). Os testes convencionais e complementares utilizados neste estudo não foram capazes de prever essa diferença na congelabilidade entre os

machos, em que as características espermáticas do sêmen pós-descongelamento são distintas das observadas no sêmen *in natura*, comprovada pela ausência ou baixa correlação entre as características seminais pré e pós-descongelamento (Tabela 2).

Considerando os melhores resultados de viabilidade espermática pós-descongelamento com os testes *in vitro* obtidos pelo sêmen criopreservado com o protocolo 3 e, considerando o número restrito de fêmeas disponíveis na granja para realização da inseminação, a avaliação da fertilizada *in vivo* (inseminação das fêmeas) foi realizada apenas com o sêmen proveniente do protocolo 3.

Com relação à avaliação da fertilidade *in vivo* do sêmen congelado/descongelado, durante as inseminações, foi possível a introdução do cateter no lúmen uterino de todas as fêmeas (14). Entre todas as fêmeas, somente 28,6% (4/14) ficaram gestantes, produzindo média de 8,0 leitões nascidos no total, variando entre 3 e 11 leitões nos partos. Benevides Filho et al. (1985) registraram médias em torno de 8,75 leitões nascidos totais para a mesma raça utilizando monta natural. Embora a média de leitões nascidos verificada neste estudo tenha sido relativamente próxima às relatadas na literatura para a raça Piau, não é possível inferir que a técnica de inseminação utilizada possui potencial fertilizante semelhante ao das alcançadas por monta natural, uma vez que a concentração espermática utilizada é muito pequena em comparação à monta natural. Além disso, o sêmen congelado possui fertilidade sabidamente inferior e o número de porcas inseminadas é baixo. A alta taxa de leitões nascidos com o uso do sêmen congelado neste estudo seria a de que inseminações realizadas de 4 a 8 horas antes da ovulação, mesmo com número reduzido de espermatozoides. Segundo Grossfeld et al. (2008), concentrações de 1×10^9 espermatozoides/dose resultam em fertilidade estatisticamente semelhante quando comparadas às obtidas com o uso de sêmen resfriado. Presume-se que as três porcas que pariram maior quantidade de leitões (média de 9,66 leitões nascidos totais) foram

Tabela 3 - Médias e desvio-padrão de alguns parâmetros espermáticos pós-descongelamento apresentados pelos diferentes machos suínos utilizados no experimento

Parâmetro	Machos				
	1 (n=5)	2 (n=4)	3 (n=5)	4 (n=3)	5 (n=5)
MOTP2	30,0±7,9ab	41,3±11,1a	29,0±4,2ab	29,0±10,8ab	15,0±8,7b
MOTP3	64,0±5,5a	45,0±7,1b	40,0±11,2b	40,0±10,0b	54,0±6,5ab
SUPP3	53,2±6,8a	35,5±9,8b	38,8±5,5ab	33,3±12,9b	35,2±6,0b
ACRP3	60,8±6,5a	37,5±7,3b	48,8±13,4ab	29,0±19,7b	39,4±4,2b

MOT P2 = motilidade espermática pós-descongelamento do protocolo 2; MOT P3 = motilidade espermática pós-descongelamento do protocolo 3; SUP P3 = coloração supravital do protocolo 3; ACR P3 = porcentagem de acrossomas normais do protocolo 3.

a, b - Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($P < 0,05$).

inseminadas em momento muito próximo à ovulação. No entanto, deve-se ressaltar a baixa taxa de fertilidade (28,6%) registrada, sugerindo que o momento ideal da inseminação em relação ao momento da ovulação não foi alcançado em todas as fêmeas e que o número de fêmeas inseminadas ainda é muito reduzido.

Como a inseminação artificial foi realizada com uso de sêmen congelado, especial atenção deve ser dada ao momento da inseminação, pois é menor o período necessário para a capacitação dos espermatozoides e menor também seu tempo de permanência no oviduto (Roca et al., 2003). Dessa forma, o momento da inseminação artificial pode ter influenciado especialmente a taxa de fertilização e melhores resultados poderão ser obtidos com a inseminação realizada o mais próximo possível do momento da ovulação, com acompanhamento da ultrassonografia. Bianchi et al. (2008) registraram valores de 48,6 e 59,4% de taxa de fertilização após inseminação pós-cervical com doses de 1×10^9 espermatozoides de sêmen congelado de suínos utilizando glicerol e dimetilacetamida como crioprotetor.

Conclusões

O protocolo de congelamento preconizado por Ohata et al., com período de equilíbrio de 90 minutos a 22-26 °C, permite obter melhores resultados de viabilidade espermática *in vitro* em comparação aos outros dois protocolos. A ausência de período de equilíbrio do protocolo 1 e a curva de resfriamento utilizada no protocolo 2 afetam negativamente os parâmetros de viabilidade espermática avaliados no presente estudo. Apesar dos resultados satisfatórios *in vitro* para o congelamento de sêmen com a utilização do protocolo 3, o mesmo apresenta baixa taxa de fertilidade (28,6%).

Referências

- 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.
- ANTUNES, R.C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.60-63, 2007.
- BAMBA, K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. **Theriogenology**, v.29, p.1245-1251, 1988.
- BENEVIDES FILHO, I.M.; SCHLINDWEIN, A.P.; LÔBO, R.B. Estudo genético do desempenho de suínos da raça Piau do nascimento à desmama. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, n.2, p.497-506, 1985.
- BERGER, B.; FISCHERLEITNER, F. On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.27, p.266-270, 1992.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F. et al. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1978-1983, 2008.
- BIANCHI, I.; MADEIRA, E.M.; SCHNEIDER, A. et al. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.949, 2011.
- BORTOLOZZO, F.M.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E. et al. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 2005, 185p.
- CAVALCANTI, S.S. **Produção de suínos**. Campinas: Instituto Campeiro de Ensino Agrícola, 1984. 453p.
- ERIKSSON, B.M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.205-220, 2000.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANICH, P.L. Glycerol equilibration time revised. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.1, p.141-146, 1996.
- FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A. et al. The degree of resistance to freezing thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.72, n.6, p.784-797, 2009.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O. et al. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.599-607, 2005.
- GROSSFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C. et al. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v.70, p.1225-1233, 2008.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **The Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959.
- JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; WILLEMS, C.M.T. et al. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.52, n.5, p.1130-1135, 1981.
- JOHNSON, L.A. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham, England. **Anais...** Birmingham: Sociedade, 1998. p.225-229.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P. et al. Storage of boar semen. **Animal of Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.
- KOTZIAS-BANDEIRA, E. **Auswirkung von Kurz- und Langzeitäquilibriumierung vorder Gefrierung von Ebersperma auf Auftauqualität und Membranzustand der Samenzellen**. 1997. 97f. Thesis (Promotion in Zucht und Haltung von Schweinen) – Higher School of Veterinary Medicine Hannover, Niedersachsen, Alemanha.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.17, p.74-82, 1976.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.209-219, 1997.
- 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.
- MIES FILHO, A.; HOOGSTRATEN, M.I.M.J.V.; SCHEID, I.R. Congelabilidade do sêmen suíno, variação individual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.2, n.2, p.21-24, 1978.
- MILEHAM, A.J.; HAVEN, D.; ROHL, J. et al. Porcine semen cryopreservation in a commercial setting. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 5., 1997, Netherlands. **Anais...** Kerkrade, Netherlands, 1997. p.128.

- OHATA, P.M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M.L. et al. Viability of frozen swine semen submitted to a pre-freezing equilibrium time in the presence or absence of seminal plasma. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.29, n.2, p.123-129, 2001.
- OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R. et al. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.69-74, 2005.
- OLIVEIRA, F.J.G. **Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen de garanhões**. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ORTMAN, K.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. **Journal Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47, 1994.
- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 4.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004. 54p.
- PÉREZ-LLANO, B.; GARCÍA-YENES, P.; GARCÍA-CASADO, P. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrossome status during incubation at 37°C. **Theriogenology**, v.60, p.1401-1407, 2003.
- PURSEL, V.G.; PARK, S. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala. **Anais... Uppsala**, 1985. p.147-166.
- ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS X. et al. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.77-87, 2003.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G. et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2692-2699, 2010.
- 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.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing 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. **The Veterinary Quarterly**, v.19, n.3, p.135-138, 1997.
- WOELDERS, H.; TEN NAPEL, J. Semen in straws. **Pig International**, v.35, n.4, p.10-14, 2005.