

ASPECTOS GERAIS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

(General aspects of boar semen cryopreservation)

Ricardo TONIOLLI¹; Ludymila Furtado CANTANHÊDE²

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LabSuis)/UECE; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE, Av. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi, Fortaleza-Ce. CEP: 60.740-000, E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

A utilização de sêmen congelado para inseminações artificiais já vem sendo estudada há mais de 30 anos e os avanços nesta área se devem principalmente às pesquisas dos diferentes fatores que influenciam a conservação do sêmen e fertilidade de um ejaculado. O protocolo ideal de criopreservação não foi totalmente elucidado por pesquisadores da área, apesar de ser bastante utilizado para conservação de tecidos e de células, como os espermatozoides. Isto se deve ao fato de que o sucesso da criopreservação depende de diferentes parâmetros, entre eles a utilização de crioprotetores; bem como uma concentração adequada, o que varia de espécie para espécie. Vários estudos foram feitos para se obter uma melhor congelação de sêmen suíno, com o objetivo de diminuir os índices de crioinjúrias causados pelo abaixamento de temperatura. Apesar de ainda existirem muitos problemas no processo de criopreservação de sêmen do varrão, alguns autores relatam que o uso do sêmen congelado superará o do sêmen resfriado, por ser um procedimento que permite preservar células por longos períodos de tempo. Este trabalho teve como objetivo relatar os principais problemas ligados à congelação de sêmen e os avanços da técnica utilizada para tal, através de um levantamento geral acerca dos principais aspectos ligados à criopreservação, com ênfase na espécie suína.

Palavras-chave: Conservação, crioprotetores, sêmen, varrão.

ABSTRACT

The use of frozen semen for artificial insemination has been studied for over 30 years and the advances in this area are mainly due to research the different factors that influence the semen retention and fertility of an ejaculate. The optimal protocol for cryopreservation has not been fully elucidated by researchers in the field, even though it is often used for preservation of tissues and cells such as sperm cells. This is due to the fact that the success of cryopreservation depends on different parameters, among them the use of cryoprotectants as well as a suitable concentration, which differ between species. Several studies were made seeking a better freezing of boar semen, also, aiming to reduce the rates of freezing damages caused by the lowering of temperature. Although there are still many problems in the process of cryopreservation of boar semen, some authors report that the use of frozen semen, outrank the cooled semen, due to a procedure that preserves cells for long periods of time. This study aimed to report the main problems associated with

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

freezing semen, and technique advances through a general survey about the main aspects of cryopreservation with emphasis on swine.

Key-words: Conservation, cryoprotectant, sperm, boar.

INTRODUÇÃO

O aumento do volume de produção e consumo de carne suína nos últimos anos acarretou na necessidade de produção de animais com elevada eficiência reprodutiva. A inseminação artificial, apesar de ter vantagens em relação à monta natural, ainda possui fatores limitantes à sua otimização. Seria essencial para a lucratividade do setor suínico a prática de procedimentos corretos de conservação de sêmen, melhoria nos resultados e diminuição dos investimentos e custos (WOLDERS e TEN NAPEL, 2005).

Para que seja possível uma boa conservação espermática durante períodos prolongados, seria necessária que a integridade celular seja preservada, bem como se reduzir a atividade metabólica. Adicionalmente, uma curva ideal de abaixamento de temperatura e a diluição do sêmen em meios adequados seriam cuidados a serem tomados (SÁNCHEZ, 2003). O resfriamento e a congelação são duas formas de conservação seminal. Através da redução da temperatura, prolonga-se a viabilidade dos espermatozoides, devido à desaceleração dos processos metabólicos celulares (ALMOND *et al.*, 1994).

O estudo e utilização de sêmen congelado em programas de inseminação artificial (IA), vem acontecendo há várias décadas, com os primeiros resultados em suínos nos anos 1970. Os avanços nesta área se deveriam às pesquisas de diferentes fatores, que influenciariam na fertilidade como o envase do sêmen, diferentes diluentes, curva de resfriamento, descongelação e diferentes crioprotetores (EDASHIGE *et al.*, 2007).

A criopreservação seria definida como a manutenção de células em temperatura criogênica (-196 °C), com a diminuição ou interrupção de reações químicas, processos biológicos e físicos, intra e extracelulares (BAKHACH, 2009). Dentre seus benefícios, encontra-se a conservação e utilização do sêmen por longos períodos, reduzindo riscos e custos com a aquisição e transportes de reprodutores, além da rápida difusão genética e formação de bancos de sêmen de alto valor genético. Diante da importância deste processo, o presente trabalho apresenta um levantamento geral, acerca dos principais aspectos ligados à criopreservação de sêmen com ênfase na espécie suína.

DESENVOLVIMENTO

Princípios da criopreservação de células animais

Uma maneira de solucionar problemas relacionados ao armazenamento de espermatozoides, ovócitos e embriões seria a utilização de técnicas de criopreservação, que

*Endereço para correspondência:

ricardo.tonioli@uece.br

visariam diminuir o metabolismo celular, sendo assim possível a sua conservação por tempo indeterminado. O primeiro sucesso dessa técnica foi mencionado por Whittingham (1971), utilizando embriões de camundongos. Com o surgimento dos bancos de sêmen e o avanço de tecnologias na reprodução assistida, o processo de criopreservação tornou-se essencial. Por isso, um dos grandes desafios para a criobiologia é desenvolver um método eficiente de criopreservação de células e tecidos (PYLES, 2013).

Na criopreservação, se faria uma remoção de água das células, antes de sua congelação. Se essa desidratação não ocorrer, cristais de gelo se formariam, lesando as estruturas intracelulares. O mecanismo de ação dos crioprotetores se basearia no abaixamento do ponto de solidificação da solução a ser congelada, permitindo um maior tempo para a desidratação da célula e diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares. Os crioprotetores interagiriam com a membrana celular, exercendo ação estabilizadora, durante as mudanças de estado físico do meio de conservação (SEIDEL JR., 1986).

Mesmo com curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas, ainda não existiriam técnicas de criopreservação que permitissem cem por cento de sobrevivência celular. Apesar de todos os efeitos benéficos dos crioprotetores, sua toxicidade limitaria a concentração utilizada e, portanto, sua eficácia de proteção (FAHY, 1986). Podem, também, ter uma ação direta na produção de crioinjúrias, com origens ainda incertas, com algumas evidências de que ocorreriam alterações no reordenamento lipídico e desorganizando as associações lipoproteicas, indispensáveis para o seu bom funcionamento (ARNOLD *et al.*, 1983).

Crioprotetores

Os agentes crioprotetores seriam essenciais em, praticamente, todos os sistemas biológicos (FAHY, 1986) e visariam aumentar a sobrevivência das células, durante e após a criopreservação (AMANN e PICKET, 1987). Diversos estudos têm procurado encontrar um crioprotetor ideal, porém a concentração utilizada variaria com a espécie animal e o grau de sensibilidade celular. O crioprotetor ideal deveria possuir um baixo peso molecular, boa solubilidade em água e mínima toxicidade aos espermatozoides.

Em todas as técnicas de congelação ocorreria a adição de substâncias crioprotetoras, que protegeriam as células ou tecidos dos danos ocasionados pela baixa temperatura e que seriam classificadas em duas categorias: intracelulares, ou permeáveis e extracelulares, ou não permeáveis (MARIA, 2005), utilizados juntos ou separados, em diferentes protocolos de criopreservação (YOUNG *et al.*, 1998).

Os crioprotetores intracelulares agiriam, retirando a água da célula por diferença osmótica, diminuindo sua temperatura de congelação e a formação de cristais de gelo. Os extracelulares seriam substâncias de alto peso molecular; por isso, não atravessariam a membrana plasmática. Atuariam sobre a superfície da célula, estabilizando sua membrana, reparando e diminuindo os possíveis danos causados pelo processo de congelação

*Endereço para correspondência:

ricardo.tonioli@uece.br

(CAROLSFELD e HARVEY, 1999). A combinação dos dois tipos acima permitiria uma proteção mais completa do espermatozoide (LEUNG e JAMIESON, 1991).

Características e congelamento do ejaculado suíno

O ejaculado suíno poderia variar com a idade do animal, estação do ano, intervalo entre coletas, estado nutricional e raça. O varrão seria o maior produtor de volume de sêmen por ejaculado dentre as espécies de interesse zootécnico, com médias entre 150 a 500 mL. Seu ejaculado seria constituído de três porções: uma primeira fase, pobre em espermatozoides; uma fase intermediária, a mais rica em células espermáticas e a última, que formaria o tampão vaginal, constituída de material gelatinoso (CAVALCANTI, 1998).

A congelamento de sêmen suíno é um método demorado e complexo, sendo necessárias de 7 a 9 horas, da coleta à congelamento propriamente dita. As amostras são submetidas a uma curva de resfriamento, visando a manutenção da viabilidade espermática pós-descongelamento. São inúmeros os protocolos utilizados para criopreservação de sêmen suíno, variando desde o crioprotetor, a velocidade no abaixamento de temperatura, os tipos de embalagens para conservação e os métodos de descongelamento (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

Desde a década de 1970, vários estudos foram realizados para melhorar as técnicas de conservação de sêmen suíno. Os resultados de fertilidade com sêmen congelado ainda seriam inferiores aos obtidos com o sêmen refrigerado (RUALCABA *et al.*, 2003). Apesar da baixa produtividade do sêmen congelado, as perspectivas para o uso dessa técnica pareceriam promissoras, devido aos avanços de novas tecnologias e o aprimoramento de equipamentos de congelamento do sêmen (WOLDERS e TEN NAPEL, 2005).

O sêmen suíno seria o mais sensível às flutuações de temperatura (CORRÊA *et al.*, 2001) em relação a outros mamíferos domésticos. Temperaturas abaixo de 15 °C seriam causas de choque térmico, com perda irreversível da motilidade e lesões nas estruturas celulares. Temperaturas acima dos 18 °C, não reduziriam de forma eficiente o metabolismo espermático e facilitariam a multiplicação de bactérias (SCHEID, 2003). Estudos relacionados com avaliação e efeito de diferentes crioprotetores, diluentes, curvas de abaixamento de temperatura, diferentes tipos de envases teriam como objetivo amenizar as crioinjúrias sofridas pelos espermatozoides (ANTUNES, 2007).

Durante a criopreservação, a primeira mudança seria uma transição de fase dos lipídios de membrana, que variaria, de acordo com a constituição da mesma e passaria de fluida para gel, afetando a sua movimentação lateral e formando um arranjo hexagonal regular, podendo ocorrer uma separação lateral e a formação de locais ocupados somente por lipídios. As proteínas ficariam excluídas desses agrupamentos hexagonais, permanecendo em locais onde os lipídios ainda permanecessem em seu estado fluido e suas funções necessárias ao transporte de íons e integridade da membrana poderiam ser afetadas (WOELDERS, 1997). A mudança de fase dos lipídios estaria concentrada entre 15

*Endereço para correspondência:

ricardo.tonioli@uece.br

e 5 °C, intervalo onde o espermatozoide suíno estaria submetidos aos efeitos da transição de fase lipídica (WATSON, 2000).

Limitações na criopreservação do sêmen suíno

Na suinocultura, a utilização de doses congeladas na IA ainda possuiria custos elevados, com um menor número de doses de sêmen obtidas por ejaculado e uma grande variação da congelabilidade entre diferentes reprodutores (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

O uso de sêmen congelado seria, ainda, limitado em suínos, com uma diminuição de fertilidade associada a alterações moleculares na membrana acrossomal, produção de espécies reativas ao oxigênio, instabilidade da membrana espermática após a descongelação (BREININGER *et al.*, 2005) e uma desestabilização na estrutura da cromatina em espermatozoides (FRASER e STRZEZEK, 2007).

Ao serem congelados, os espermatozoides sofreriam mudanças físico-químicas, devido às crio-injúrias, podendo ocorrer modificações no citoesqueleto, alterações na arquitetura das mitocôndrias, quebra da assimetria da membrana espermática e condensação da cromatina (WATSON, 1995).

Apesar da separação lateral de lipídios da membrana do espermatozoide, com a diminuição de temperatura, ele é um processo reversível com o aumento da mesma, mas seu funcionamento pode ser alterado de forma irreversível. Perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática, aumento da permeabilidade e perturbação no processo de difusão, seriam algumas das alterações decorrentes da separação de fases (De LEEUW *et al.*, 1990).

O sêmen suíno seria um dos mais sensíveis ao choque térmico, com maior segregação de partículas durante o processo de congelamento. Essa sensibilidade pode ser explicada pela baixa relação colesterol/lípideos do sêmen. A presença do colesterol seria importante na membrana, pois interferiria no comportamento dos lipídios, durante as mudanças de fase (De LEEUW *et al.*, 1990), com uma alta proporção de proteínas/fosfolípideos na membrana espermática e ponto de fusão relativamente alto (PARKS e GRAHAM, 1992).

O espermatozoide do varrão também seria mais suscetível ao estresse osmótico, devido às mudanças de volume durante a congelamento (WATSON, 1995). A curva de temperatura (congelamento e descongelamento) seria essencial para preservar a integridade dessas células. Uma vez que, a congelamento muito rápida ou uma descongelamento muito lenta, favoreceriam a formação de cristais de gelo intra e extracelular, respectivamente.

Os atuais meios de conservação representariam os conhecimentos de diferentes grupos de pesquisa sobre as necessidades da célula espermática e sua conservação por refrigeração (SÁNCHEZ, 2003). Apesar disso, ainda seria desconhecido o diluente e a temperatura ideal, capazes de oferecer maior longevidade aos espermatozoides suínos.

*Endereço para correspondência:

ricardo.tonioli@uecc.br

Crioprotetores intracelulares

Etilenoglicol (EG)

Ele possuiria um baixo peso molecular, o que permitiria uma rápida entrada e saída do meio intracelular, durante o período de equilíbrio e rehidratação. O EG seria menos tóxico do que outros crioprotetores (CETIN e BASTAN, 2006), sendo utilizado em diversos protocolos, para a criopreservação de ovócitos e embriões em materiais biológicos de várias espécies (VOELKEL e HU, 1992).

O EG teria uma boa ação protetora para a célula espermática suína, proporcionando uma boa manutenção pós-descongelação de algumas características, como o vigor espermático, a motilidade espermática, a integridade acrossomal, a vitalidade espermática e a integridade de membrana. Esta ação benéfica seria equivalente à de outros crioprotetores intracelulares como o glicerol e o propilenoglicol. Dessa forma, o crioprotetor de eleição continuaria sendo o glicerol, uma vez que já seria usado como rotina nos protocolos de congelamento do sêmen suíno. Os valores encontrados para o número de espermatozoides vivos, com acrossoma intacto, utilizando-se esses três crioprotetores, foram inferiores a 50%, apresentando um percentual de queda entre 25 e 36 pontos. Os resultados demonstraram que o tipo de crioprotetor utilizado não influenciou nos resultados finais desta característica (TONIOLLI *et al.*, 2015).

O espermatozoide do varrão, seria o mais sensível ao processo de congelamento, com o aparecimento de danos de membrana e de organelas celulares, devido ao estresse osmótico, ao choque térmico e à formação de gelo intra-celular (WATSON, 1995). Dessa forma, uma melhor combinação entre tipo de crioprotetor e técnica de congelamento, ainda precisaria ser encontrada (PENA *et al.*, 2003).

Glicerol (GLI)

O glicerol seria um crioprotetor permeável à membrana e protegeria o espermatozoide da formação de cristais de gelo, durante a congelamento, reduzindo os danos da membrana celular (PURDY, 2005). Foi o primeiro crioprotetor a ser utilizado na congelamento de espermatozoides (POLGE *et al.*, 1949). Porém, as concentrações utilizadas poderiam interferir na capacidade de fecundação, por apresentar certo grau de toxicidade (PURDY, 2005).

O glicerol teria a função de aumentar o volume de canais de solventes descongelados e diluir as concentrações de sais, durante o resfriamento (SQUIRES *et al.*, 1999). Seria largamente utilizado para a congelamento de sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos variaria de 3% a 9% (LEBOEUF *et al.*, 2000). Entretanto, sua presença estaria relacionada com a queda da fertilidade do sêmen congelado, em equinos (SQUIRES *et al.*, 1999).

O glicerol seria considerado um álcool, com três grupos funcionais de hidroxilas, as quais receberiam um hidrogênio da molécula de água, em seis sítios diferentes. Seu efeito crioprotetor estaria relacionado com a capacidade de se ligar com a água,

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

diminuindo a osmolaridade do meio de congelação, tendo facilidade em atravessar a membrana celular e manter a osmolaridade interna e externa. A concentração utilizada seria limitada, devido à sua toxicidade, que dependeria da taxa de resfriamento, da velocidade de congelação, da composição do diluente e do método de adição (FAHY, 1986; WOELDERS 1997). Promove alterações nos microtúbulos e a induziria a uma rápida reação acrossomal (SLAVIK, 1987).

Apesar do glicerol ter, também, efeito tóxico sobre a célula, ele tem sido o crioprotetor mais utilizado em protocolos de congelação do sêmen suíno (TONIOLLI et al., 2015), uma vez que a viabilidade espermática seria normalmente reduzida, devido a injúrias celulares, provocadas durante todo o processo de congelação (BIANCHI et al., 2006). Assim sendo, o uso de um crioprotetor eficiente seria importante, sendo ele a substância de eleição utilizada para a proteção do espermatozoide suíno, em protocolos de congelação do sêmen (SCHEID, 1992).

Por outro lado, a utilização do glicerol em baixas concentrações (1-3%) permitiria uma melhor sobrevivência espermática, após a descongelação do sêmen (ALMLID e JOHNSON, 1988). Um melhor efeito de crioproteção, favorecendo a integridade acrossomal, poderia ser negativamente afetada, com um aumento da concentração do glicerol (YI et al., 2001).

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Em 1867, o químico Alexander Saytzeff sintetizou o dimetilsulfóxido (DMSO), descrevendo sua notável capacidade solvente (STONE, 1993). Como crioprotetor, o DMSO foi utilizado, pela primeira vez, na criopreservação de sêmen de touro (LOVELOCK e BISHOP, 1959). Desde então, esta ação vem se destacando e tem sido largamente utilizada na criopreservação de folículos ovarianos (KIM *et al.*, 2010), oócitos (MAHMOUND *et al.*, 2010) e embriões (KUMAR *et al.*, 2010).

Uma elevada capacidade higroscópica decorreria da sua intensa afinidade pelo hidrogênio e extrema capacidade de penetração e difusão. Sua toxicidade seria reconhecidamente baixa (BRAYTON, 1986; STONE, 1993), com capacidade citoprotetora (KOTERBA *et al.*, 1990) superior ao do glicerol (BRAYTON, 1986).

As amidas, incluindo o DMSO, devido a seu baixo peso molecular (glicerol = 92g/mol; metilformamida = 59g/mol e dimetilformamida = 73g/mol), possuiriam alta permeabilidade na membrana, penetrando com maior rapidez e reduzindo a possibilidade de dano celular por estresse osmótico (BALL e VO, 2001). Seu efeito crioprotetor poderia ser atribuído à sua habilidade de permear a membrana da célula, permitindo uma mais eficiente ligação às moléculas de água (BALL e VO, 2001; KAROW, 2001).

O DMSO tem sido utilizado com sucesso na criopreservação de gametas e embriões, por ser um álcool dipolar, sendo capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas; sem alterar, de forma irreversível, a configuração das moléculas (SOJKA *et al.*, 1990). Essa substância seria considerada relativamente atóxica (WUSTEMAN *et al.*, 2008). O DMSO atravessaria rapidamente as

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

membranas, por difusão. Recentemente, através de estudos com injeção intraocitária de RNA através do canal proteico aquaporina-3 em oócitos de rã, foi demonstrado, pela primeira vez, o transporte de DMSO por essa via, mesmo em condições de baixo gradiente de concentração (YAMAJI *et al.*, 2006).

Crioprotetores extracelulares

Gema de ovo (GO)

A composição dos diluentes seria um dos fatores que afetaria a proporção de células vivas, após a descongelação. A maioria possuiria a gema de ovo em sua constituição, uma vez que a fosfatidilcolina e a lipoproteínas da gema, bem como a caseína nos diluentes à base de leite, teriam uma ação protetora sobre as células espermáticas, contra o choque térmico. A LDL, uma lipoproteína de baixa densidade, presente na gema de ovo, pode agregar-se à membrana plasmática, durante o processo de congelamento, evitando a perda de fosfolípidios da membrana e diminuindo as crioinjúrias (DAS, 1995).

O uso da gema de ovo poderia aumentar o risco de contaminação microbiana, o que poderia reduzir a capacidade de fertilização dos espermatozoides (AIRES *et al.*, 2003). Em algumas espécies, como carneiro (WASTON e MARTIN, 1975), cabra (ABOAGLA e TERADA, 2004) e búfalo (KUMAR *et al.*, 1993), poderia reduzir a viabilidade e a integridade do acrossoma. Toniolli *et al.* (2010) compararam a ação crioprotetora da gema de ovo *in natura* e de outra, em pó, sem resultados significativos nos parâmetros analisados; sendo que a melhor condição sanitária da gema de ovo em pó poderia minimizar os efeitos deletérios da contaminação do diluente do sêmen.

A gema do ovo apresentaria 49% de umidade e 51% de sólidos totais; sendo que, destes, 31% seriam lipídeos totais (BARRETO *et al.*, 2006). Entretanto, ela não seria definida como um composto biológico que conteria proteínas, vitaminas, fosfolípidios, glicose, componentes bactericidas e antioxidantes (HOUPALATHI *et al.*, 2007). Outras substâncias vêm sendo estudadas para substituição deste crioprotetor, como as lecitinas de soja (HIWASA *et al.*, 2009), com o objetivo de preparar meios quimicamente definidos (HOUPALATHI *et al.*, 2007).

Açúcares

Sua utilização como crioprotetor deve levar em consideração sua propriedade química e funcionalidade. Um açúcar manteria a pressão osmótica dos diluentes por desidratação celular, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular (PURDY, 2006); interagiria com os fosfolípidios, ocorrendo estabilização de membranas (HINCHA *et al.*, 2006), reorganizaria e aumentaria a capacidade de sobrevivência espermática (BUCAK *et al.*, 2007); sendo utilizado como fonte de energia, através de glicólises e fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, visando a movimentação espermática (PONGLOWHAPAN *et al.*, 2004).

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

Dentre os açúcares utilizados nos meios diluentes para criopreservação de sêmen, estariam os simples, como a frutose e a glicose e os não penetrantes na célula, como lactose, rafinose e trealose. Dissacarídeos, como a trealose e a sacarose, interagiriam com os grupos polares, promovendo a estabilização da membrana espermática (DALIMATA e GRAHAN, 1997).

O açúcar no meio diluente seria uma fonte de energia para a motilidade espermática. Na comparação com a frutose, lactose e sacarose, o uso da glicose adicionada ao diluente BTS proporcionou melhores resultados (TONIOLLI *et al.*, 2015). Seria possível que este resultado fosse reflexo de uma melhor adaptação do metabolismo espermático a este tipo de açúcar; ou, ainda, que esteja relacionado com a necessidade de uma modificação nos protocolos de congelamento (JOHNSON *et al.*, 2000; ANTUNES, 2007).

Quando características como integridade acrossomal foram avaliadas, a utilização desses quatro tipos de açúcares não influenciaria a qualidade dos resultados obtidos. Avaliando-se o número médio de células vivas com acrossoma intacto, pode haver um percentual de queda entre 18 e 33 pontos percentuais nos resultados. Entretanto, ficaria ainda abaixo dos 50%, valores esses ainda considerados razoáveis, em se tratando de sêmen congelado (BIANCHI *et al.*, 2006).

Por outro lado, a glicose proporcionaria uma maior percentagem de espermatozoides com membrana íntegra e uma menor percentagem de células com dano total, em relação aos demais açúcares aqui citados. Esses resultados poderiam estar relacionados ao fato de que a glicose proporcionou uma proteção à membrana do espermatozoide bem melhor do que os outros açúcares (BIANCHI *et al.*, 2006). Apesar dos avanços em novas tecnologias e em equipamentos, visando a congelamento do sêmen (WOLDERS e TEN NAPEL, 2005), a glicose pareceria ser, ainda, o açúcar de eleição, para ser usado nos diluentes de congelamento.

Leite em pó desnatado (LPD)

Com relação à sua composição química, o leite teria duas proteínas biologicamente importantes para a preservação do espermatozoide. A primeira seria a lactose, que teria papel importante como componente energético e a segunda seria a caseína, que possuiria propriedades que favoreceriam o aumento da atividade cinética da célula. Adicionalmente, o leite teria uma boa capacidade tamponante, ação bactericida e uma viscosidade adequada para a manutenção de espermatozoides em meio líquido (CUNHA, 2002).

A caseína do leite diminuiria as ligações das proteínas do plasma aos espermatozoides, reduzindo a perda de lipídios da membrana celular e aumentando a proteção, durante o processo de criopreservação. Por outro lado, o efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolveria proteínas, ao invés de lipídeos (BERGERON *et al.*, 2007).

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

Esse diluente já foi testado, em protocolos para congelamento de sêmen suíno (TONIOLLI *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2013), tendo apresentado resultados que o classificariam como um diluente/conservador durante a curva de esfriamento do sêmen. O LPD, quando utilizado em protocolos de congelamento, devido à sua ação crioprotetora, proporcionou uma maior porcentagem de células vivas, após a descongelamento (BARROS *et al.*, 2015).

O leite desnatado seria um excelente meio conservador para os espermatozoides, em baixas temperaturas; de uso prático, inclusive preservando melhor a motilidade espermática do que outros diluentes (KULAKSIZ *et al.*, 2012). Segundo Memon e Ott (1981), as lipoproteínas e lecitinas do leite promoveriam a proteção da célula espermática contra o choque térmico, quando adicionadas antes do resfriamento. Inclusive, haveria relatos sobre o efeito crioprotetor do leite desnatado (JULIANI e HENRY, 2008).

Água de coco em pó (ACP)

Vários estudos de conservação espermática têm sido realizados, utilizando a ACP como diluente, em diferentes espécies. Ela seria uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento e poucos fosfolípidios (LAGUNA, 1996). Sua relação custo/benefício é favorável aos programas de IA, podendo ser utilizada sob diferentes apresentações. Após a correção da osmolaridade e do pH, se apresentaria como um diluente eficiente para o sêmen de diferentes espécies (SALGUEIRO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2007).

Ela seria um diluente alternativo de baixo custo, fácil preparo e padronizado, oriunda de fruto tipicamente tropical (CARDOSO *et al.*, 2005). O ACP, após a sua ressuspensão, apresenta características bioquímicas muito similares às da água de coco *in natura* (SALGUEIRO *et al.*, 2002), sendo facilmente armazenada e enviada para regiões onde o fruto não seria encontrado (CARDOSO *et al.*, 2005).

Os protocolos de criopreservação do sêmen do varrão, se caracterizariam pela maior sensibilidade à ação do frio, durante a queda da temperatura, trazendo ainda grandes desafios para o desenvolvimento de uma técnica viável para o sêmen dessa espécie (ANTUNES, 2007). A curva de resfriamento do sêmen seria um importante fator a ser considerado, visando a obtenção de uma maior porcentagem de células viáveis, que serão, em seguida, congeladas (JOHNSON *et al.*, 2000).

A utilização do ACP em protocolos de resfriamento do sêmen suíno proporcionaria uma melhor qualidade espermática, favorecendo ao ejaculado entrar em melhores condições, na zona mais crítica de temperatura, abaixo dos 15 °C. Na análise da integridade da membrana plasmática, o ACP (65,6%) mostrou-se mais eficiente do que o BTS (58,0%) na proteção do espermatozoide (TONIOLLI *et al.*, 2014). Esta ação protetora do ACP sobre as membranas, poderia acarretar, no decorrer do processo, numa maior recuperação de espermatozoides capazes de fertilizar após a descongelamento, uma vez que sabe-se que danos na membrana reduziram essa capacidade (MAXWELL e JOHNSON, 1997).

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

A eficiência crioprotetora do ACP foi comprovada no sêmen de cães, quando comparada ao diluente padrão TRIS, sendo ambos eficazes para essa finalidade (SILVA *et al.*, 2005). Testada em sêmen de gatos domésticos, mostrou-se eficiente na manutenção da qualidade espermática, com motilidade e vigor superiores a 70% e 3,5, respectivamente (SILVA *et al.*, 2007). Na espécie suína, o ACP também apresentou bons resultados, quando comparado ao diluente BTS, mantendo uma melhor motilidade espermática aos 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação (TONIOLLI *et al.*, 1996; TONIOLLI *et al.*, 1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criobiologia vem conquistando o seu espaço há algum tempo, em diferentes áreas e, principalmente, na reprodução, por permitir a conservação de células para diferentes finalidades. A criopreservação de espermatozoides vem sendo empregada na IA há mais de trinta anos, permitindo maior tempo de conservação do sêmen para seu uso posterior. Apesar dessa técnica já ser estudada há bastante tempo, estudiosos ainda não sabem, ao certo, qual o melhor crioprotetor e melhor curva de resfriamento e descongelamento para as células espermáticas. Com relação ao sêmen suíno, diferentes pesquisas vêm sendo feitas, com a finalidade de amenizar o choque térmico e o efeito tóxico de alguns crioprotetores e apontaram para um futuro promissor, com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelamento de sêmen suíno.

REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effect of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1160-72, 2004.
- AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v.60, p.269-79, 2003.
- ALMLID, T., JOHNSON, L.A., Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol 172 addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science*, v.66, p.2899-2905, 1988.
- ALMOND, G.W.; BRITT, J.H.; CARR, J.; FLOWER, W.; GLOSSOP, C.; MORROW, M.; SEE, T. A field and laboratory technician's guide to artificial insemination en swine. *The AI book*, p.180, 1994.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v.7, n.3, p.145-174, 1987.

*Endereço para correspondência:
ricardo.toniolli@uece.br

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

ARAÚJO, L.R.S.; DIAS, A.V.; BARROS, T.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; TONIOLLI, R. Adição de betaina ao diluente leite em pó desnatado durante a conservação do sêmen do varrão a 10 °C. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, Fortaleza*, v.20, n.4, p.234-240, 2013.

ARNOLD, K., PRATSCH, L., GAWRIS, H.K. Effect of poly (ethylene glycol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. *Biochemistry and Biophysic Acta*, v.782, p.121-128, 1983.

BAKHACH, J. Cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of diferent type of tissues. *Organogenesis, Georgetown*, v.5, n.3, p.119-126, 2009.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectans on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v.22, p.1061-1069, 2001.

BARBOSA, C.C.; LOPES-NETO, B.E.; MADEIRA, V.L.H.; LIMA, A.H.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Criopreservação de sêmen canino com diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106): Efeito da concentração de gema de ovo, Curitiba, PR, 2007. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007. Belo Horizonte: CBRA, 2007.

BARRETO, S.C.S.; ZAPATA, J.F.F.; FREITAS, E.R.; FUENTES, M.F.F.; NASCIMENTO, R.F.; ARAÚJO, S.R.S.M.; AMORIM, A.G.N. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.1767-1773, 2006.

BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, ALV.; SOUZA, L.P.; FEUGANG, J.M.; TONIOLLI, R. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar semen freezing procedure. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.36, n.3, suppl. 1, p.2023-2030, 2015.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biology of Reproduction*, v.77, p.120-126, 2007.

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

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Veterinary*, v.76-90, 1986.

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uecc.br

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.2126-2135, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Copyright, Porto Alegre, Brasil, 185p., 2005.

BUCAK, M.N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, v.73, p.103-108, 2007.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.2, n.4, p.257-262, 2005.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.J. Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática. Curso de treinamento brasileiro. Tradução HP. Godinho. Victória, Canadá: World Fisheries Trust, p.47, 1999.

CAVALCANTI, S.S. Suinocultura Dinâmica. MZV Editora, Minas Gerais, Brasil, 494p, 1998.

CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification on straws. *Animal Reproduction Science*, v.92, p.29-36, 2006.

CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Copyright. Pelotas, Brasil, p.194, 2001.

CUNHA, I.C.N. Criopreservação do semen de cães. 2002. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 137p.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K.; Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v.49, p.831-841, 1997.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg glycerol extender. *International Journal of Animal Science*, v.10, p.127-128, 1995.

DE LEEUW, F.E.; CHING CHEN, H.; COLENBRANDER, B.E.M.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.

EDASHIGE, K.; OHTA, S.; TANAKA, M. Role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biology of Reproduction*, Nova York, v.77, n.2, p.365-375, 2007.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v.23, p.1-13, 1986.

*Endereço para correspondência:

ricardo.tonioli@uece.br

FRASER, L.; STRZEZEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology*, v.68, p.248-257, 2007.

HINCHA, D.K.; POPOVA, A.V.; CACELA, C. Effects of sugars on the stability and structure of Lipid membranes during drying. In: Leitmannova, A. (Ed.), *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic Press, p.27-189, 2006.

HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.55, p.50-54, 2009.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. *Bioactive egg compounds*. New York: SpringerVerlag, p.296, 2007.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1, p.143-172, 2000.

JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides equinos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.5, p.1103-1109, 2008.

KAROW, A. M. For mammalian embryologists. Georgia, USA: Augusta. *Cryobiology*, v.34, p.1-37, 2001.

KIM, G.A.; KIM, H.Y.; KIM, J. W.; LEE, G.; LEE, E.; LIM, J.M. Ultrastructural deformity of ovarian follicles induced by different cryopreservation protocol. *Fertility and Sterility*, v.94, n.4, p.1548-1551, 2010.

KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. *Equine clinical neonatology*. Malvern: Lea & Febiger. p.846, 1990.

KULAKSIZ, R.; ÇEBİÇ.; AKÇAY,E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turkey Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v.36, n.2, p.177-182, 2012.

KUMAR, S.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of different extender formulation on acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa frozen in milk, Tris, and sodium-citrate dilutors. *Indian Journal of Animal Science*, p.63, p.1233-11233, 1993.

KUMAR, S.; JHAMB, D.; MAURYA, S.N. Post vitrification survival of 2-cell stage IVP buffalo embryos: effect of concentration. *Indian Journal of Animal Science*, v.80, p.99-103, 2010.

LAGUNA, L.E. *Determinações Físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (Cocos nucifera) coco da praia e anão*. 1996. 56p. Monografia de especialização, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

*Endereço para correspondência:

ricardo.tonioli@uece.br

- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.
- LEUNG, L.K.P.; JAMIESON, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B.G.M. (Ed.). *Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press. Cap.20, p.245-295, 1991.
- LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M.W.H. Preservation of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*, v.183, p.1394-1395, 1959.
- MAHMOUD, K.G.H.M.; SHOLKAMY, T.H.; AHMED, Y.F.; SEIDEL, G.E.; NAWITO, M.F. Effect of different combination of cryoprotectantes on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.565-571, 2010.
- MARIA, A.N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 2005. 71p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.
- MAXWELL, W.M.C.; JONHSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.
- MEMON, M. A.; OTT, R. S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Review of Animal Production*, v.17, n.1, p.19-25, 1981.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A. S. Revival of spermatozoa after vetrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666-673, 1949.
- PONGLOWHAPAN, S.; ESSËN-GUSTAVSSON, B.; LINDE FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, v.62, n.8, p.1498-1517, 2004.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.62, p.157-165, 2005.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* v.63, n.3, p.215-225, 2006.
- PYLES, E. Criopreservação de embriões e oócitos. Acesso em: 19 de ago. 2013. Disponível em: <http://www.bioembryo.com.br/noticias.php?cat=1&subcat=2&id=188>
- RUVALCABA, G.J.A.; DE ALBA, C.; CORCUERA, B.D.; CONDE, P.; HIGUERA, M.; CASANOVA, B.; DE MARTIN, C. Avanços nas técnicas de descongelamento e aplicação do sêmen suíno congelado. *Suínos Cia*, n.3, p.42-44, 2003.

*Endereço para correspondência:
ricardo.tonioli@uece.br

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. Revista Brasileira de Reprodução Animal, sup.1, n.5, p.96-98, 2002.

SÁNCHEZ, R.S. Conceito e fundamentos utilizados na inseminação artificial de suínos. Suínos & Cia, n.2, p.18-22, 2003.

SCHEID, I.R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: Development and current use. Reproduction in Domestic Animals, v.26., p.299-301, 1992.

SCHEID, I.R. Transportando e armazenando corretamente as doses de sêmen. Suíno & Cia, n.2, p.25-31, 2003.

SEIDEL Jr., E.G. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short course proceedings. Presented by Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA: 6, 1986.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Comparação entre água de coco em pó (ACP[®]) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v.43, n.6, p.767-774, 2005.

SILVA, T.F.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007, Curitiba, PR, 2007. Belo Horizonte: CBRA, 2007.

SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. Journal of Reproduction and Fertility, v.79, p.99-103, 1987.

SOJKA, J.E.; BRISSON-KIMMICK, S.V.; CARLSON, G.P.; COPPOC, G.L. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners. v.36, p.683-690, 1990.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; Mc CUE, P.M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. p.80, (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. n.9), 1999.

STONE, R.W. Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide. Canine Practise, v.18, p.16-19, 1993.

TONIOLLI, R. Pouvoir fécondant des spermatozoides de verrat: amélioration des conditions de conservation. 1996, 91p. These (Doctorat) - Université Francois Rabelais de Tours - France, 1996. Resumo disponível em <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=182303>>.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.; CAVALCANTE, S.G. Avaliação “*in vitro*” do sêmen de suíno diluído em BTS na água de coco “*in natura*” e estabilizada. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.22, n.4, p.198-201, 1998.

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

TONIOLLI, R.; JATAHY, P.C.; SILVA, M.C.; MOREIRA, F.R.da C. Utilização do leite desnatado e do ácido 3-indol acético na conservação do semen suino. *Ciência Animal*, v.11, n.1, p.21-26, 2001.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C. Utilização da gema de ovo em pó no processo de congelação do sêmen do varrão. *Ciência Animal*, v.20, n.2, p.103-110, 2010.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C. Uso da água de coco em pó no processo de congelação do sêmen suino: I Controle durante o abaixamento da temperatura entre 30 e 15 °C. *Ciência Animal*, v.24, n.2, p.60-72, 2014.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C. Uso do diluente BTS no processo de congelação do sêmen suino: II. Modificações na técnica. *Ciência Animal*, v.25, n.4, p.44-59, 2015.

VOEKEL, A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v.37, p.23-37, 1992.

WATSON, P.F.; MARTIN, C.A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5-8 °C. *Australian Journal of Biology Science*, v.28, p.145-52, 1975.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction in Domestic Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v.233, p.125-126, 1971.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, v.19, n.3, p.135-8, 1997.

WOLDERS, G.; TEN NAPEL, J. Semen in straws. *Pig International*, v.35, p.10-14, 2005.

WUSTEMAN, M.; RAUEN, U.; SIMMONDS, J.; HUNDS, N.; PEGG, D.E. Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. *Cryobiology*, v.56, p.72-79, 2008.

YAMAJI, Y.; VALDEZ, J.R. D.M.; SEKI, S.; YAZAWA, K.; URAKAWA, C.; JIN, B.; KASAI, M.; KLEINHANS, F.W.; EDASHIGE, K. Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cryobiology*, p.54, v.258-267, 2006.

Yi, Y.J.; CHEON, Y.M.; PARK, C.S. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.29-45, 2001.

*Endereço para correspondência:

ricardo.toniolli@uece.br

YOUNG, E.; KENNY, A.; PUIGDOMENECH, E.; VAN THILLO, G.; TIVERON, G.; PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. *Fertility and Sterility, Suppl.*, v.70, p.16-21, 1998.