

USO DA ÁGUA DE COCO EM PÓ NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO: III. AVALIAÇÃO DO DILUENTE ACP-103® NA RESSUSPENSÃO

(The coconut water powdered use in the swine semen freezing process:
III. Evaluation of the ACP-103® extender in resuspension)

TONIOLLI, R.¹; TONIOLLO, G.H.²; FRANCESCHINI, P.H.²; MORATO, F.M.A.C.²

¹Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700 - Campus Itaperi, Fortaleza-Ce. ²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista-Campus de Jaboticabal

RESUMO

O sêmen de oito reprodutores suínos foi coletado através da técnica da mão enluvada, sendo utilizado $10,2 \times 10^9$ spz do ejaculado total para cada tratamento. A qualidade do sêmen foi avaliada pela concentração ($\times 10^6$ spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5), percentagem de células móveis (%), morfologia espermática (%) e integridade de membrana (%). O sêmen foi diluído no Beltsville Thawing Solution (BTS) e na água de coco em pó (ACP) com antibiótico, em partes iguais (1:1). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, utilizando-se o teste de Mann Whitney, com análise das diferenças entre médias feita por variância multifatorial com o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03), a um intervalo de confiança de $p < 0,05$. A água de coco proporcionou um meio de conservação que manteve um maior número de espermatozoides com acrossoma intacto, podendo ser recomendado para uso rotineiro em laboratórios de reprodução. De uma maneira geral as modificações propostas pelo protocolo de trabalho não apresentaram os efeitos esperados, tendo o ACP apresentado melhores resultados em relação ao uso do BTS.

Palavras-Chave: diluentes, água de coco, sêmen, suíno, congelação.

ABSTRACT

The semen of eight male swine was collected by the glove-hand technique. A total of 10.2×10^9 spz was collected and distributed among the treatments. The semen quality was evaluated by means of concentration ($\times 10^6$ spz/mL), volume (mL), total of spermatozoa ($\times 10^9$ spz), spermatic strength (0 to 5), motility (%) and morphology (%) and membrane integrity of the spermatozoa (%). The semen was diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) or in coconut water (ACP), in dilution of 1:1. Randomized block design was used and the Mann-Whitney test was performed in the Lineal General Models of Statistical Analysis System Program (SAS 6.03). A 5% significance level was adopted. The coconut water extender provided the maintenance of a larger number of spermatozoids with intact acrosome and could be recommended for routine use in reproduction laboratories. However, the modifications proposed in the present study did not present as good results as use of the ACP did in comparison with the BTS solution.

Keywords: extender, coconut water, semen, swine, freezing.

INTRODUÇÃO

Os primeiros trabalhos de congelação do sêmen suíno tiveram início antes dos anos

1970. Alguns autores (POLGE *et al.*, 1970; CRABO e EINARSSON, 1971; GRAHAN *et al.*, 1971; PURSEL e JOHNSON, 1971) visualizaram a possibilidade de se conseguir uma boa taxa de fertilidade com o sêmen

*Endereço para correspondência:
toniolli@roadnet.com.br

criopreservado, apesar de um uso ainda bastante limitado (SARAIVA *et al.*, 2005) restringindo-se praticamente a difusão de material genético (SCHEID *et al.*, 1982; SCHEID e SILVEIRA, 2002). O problema do choque térmico precisa ser solucionado através do desenvolvimento de uma nova técnica de congelação para o sêmen dessa espécie (PAQUIGNON *et al.*, 1982; ANTUNES, 2007).

A possibilidade de um maior controle sanitário das doses bem como uma avaliação dos doadores de sêmen, antes de sua efetiva utilização, têm sido caminhos apontados pelas pesquisas com sêmen congelado (SMITS, 2006). Necessário se faz o desenvolvimento de diferentes métodos de avaliação, visando à seleção de reprodutores com ejaculados mais resistentes à congelação (LARSSON e EINARSSON, 1976a e 1976b; JOHNSON *et al.*, 2000), bem como a adequação de melhores condições de ressuspensão do sêmen após descongelação.

Numerosos trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de se encontrar um diluente de ressuspensão capaz de manter as características de motilidade dos espermatozoides após descongelação. Substâncias como o cálcio (ROBERTSON *et al.*, 1988), leite desnatado (SCOBAY *et al.*, 1995) e gema de ovo (PHILLIPS, 1939; SALISBURY *et al.*, 1941; SCOBAY *et al.*, 1995) foram utilizados em diluentes para o

sêmen do touro, carneiro e do homem, respectivamente. A busca da solução deste problema, levou diversos autores a trabalharem com a água de coco em pó, na conservação do sêmen do gato doméstico (SILVA *et al.*, 2007a), do cão (BARBOSA *et al.*, 2007), do carneiro (SALGUEIRO *et al.*, 2007), do macaco-prego (ARAÚJO *et al.*, 2007) e de suínos (TONIOLLI *et al.*, 1996). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da água de coco em pó (ACP-103[®]) como diluente de ressuspensão do sêmen descongelado do varrão em diferentes protocolos, a fim de se obter um maior número de espermatozoides viáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e análise do sêmen *in natura*

O sêmen de 07 (sete) reprodutores foi coletado uma vez por semana durante dez semanas consecutivas, empregando-se a técnica da mão enluvada, em copo de coleta com capacidade de 500 mL, coberto por gaze e protegido por copo térmico e contra choques, perfazendo um total de 70 ejaculados. Todos os reprodutores utilizados no experimento pertenciam ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará e encontravam-se em sistema rotineiro de coleta, sendo utilizado o ejaculado total, após separação da parte gelatinosa, através de filtro de coleta. Após a coleta, o ejaculado era

identificado e levado em seguida ao laboratório, para o seu devido processamento. A fração gelatinosa retida pela gaze era desprezada. Após estas primeiras avaliações, o sêmen foi diluído dentro da primeira meia hora após a coleta, de acordo com os tratamentos experimentais da primeira meia hora após a coleta: sêmen e diluente se encontravam sempre na mesma temperatura (30 °C).

A qualidade do ejaculado *in natura* foi avaliada através das seguintes características: volume (mL), concentração ($\times 10^6$ spz/mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996) e motilidade espermática (% células móveis). As análises do vigor e motilidade foram feitas, colocando-se uma gota de sêmen de 15 μ L entre lâmina e laminula e com leitura em microscopia ótica a um aumento de 200 vezes. Foram avaliados, para cada característica, ao menos três campos do microscópio.

Congelação do sêmen

Após a coleta e retirada da amostra de sêmen, a mesma era dividida entre os dois diluentes a serem testados (Beltsville Thawing Solution = BTS – controle e água de coco em pó + gentamicina a 80 mg/100mL = ACP-103[®]) em partes iguais (1:1), sendo diluído e incubado a 30 °C durante duas horas. O diluente ACP é oriundo da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do *spray dry*, sendo

reconstituída com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP + 100mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80 mg/100mL, com 310 de osmolaridade e 6,7 de pH. O sêmen foi congelado segundo a técnica em palhetas com volume de 0,5 mL (PAQUIGNON *et al.*, 1974). Durante o abaixamento de temperatura, foi utilizado o diluente gema de ovo/glicose (PAQUIGNON, 1984). A concentração final de glicerol foi de 2% (POLGE *et al.*, 1970).

Descongelção rápida

A descongelção foi feita em aparelho próprio com água corrente e aquecida a uma temperatura de 37 °C, na qual as palhetas eram submersas durante 50 segundos. Após a descongelção, o conteúdo de cada palheta foi ressuspensão nos diluentes testados e previamente colocados em banho maria a 37 °C. Para as análises *in vitro*, ao volume de cada palheta (0,5 mL) foi adicionado de um total de 2 mL dos diluentes de ressuspensão (BTS e ACP-103[®]). A descongelção era feita após, pelo menos, sete dias de criopreservação das amostras.

Tratamentos experimentais

Diferentes diluentes de ressuspensão: Após a descongelção, foram testados dois diluentes (BTS-controle e ACP-103[®]) para a ressuspensão do sêmen, em diferentes situações de modificação da técnica original de Paquignon *et al.* (1974), conforme a seguir:

Volumes do diluente gema de ovo:

Foram testados três diferentes volumes do diluente gema de ovo. Conforme os volumes finais formaram-se os seguintes tratamentos: T1 = 18 mL (controle); T2 = 9 mL; T3 = 6 mL.

Açúcares: Foi substituída a glicose do diluente gema de ovo/glicose por outros tipos de açúcares na mesma proporção (5,67 g), formando os seguintes tratamentos: T1 = glicose (controle); T2 = frutose; T3 = lactose.

Crioprotetores: Foram testados diferentes crioprotetores adicionados ao diluente de congelação. Manteve-se a concentração final em 2%, formando os seguintes tratamentos: T1 = Glicerol (controle); T2 = Etileno-glicol; T3 = Propileno-glicol.

Obs: Cada tratamento foi aplicado à técnica original de forma individualizada, utilizando-se sempre os dois diluentes testados (BTS e ACP)

Avaliação espermática após descongelamento

Visando as análises dos testes *in vitro*, o conteúdo descongelado de cada palheta, foi diluído e ressuspensão nos diluentes BTS e ACP. As amostras assim tratadas foram colocadas em tubos de ensaio e mantidas em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos para em seguida serem analisadas. Após a ressuspensão do sêmen

descongelado, a concentração final no tubo de ensaio foi de 100×10^6 spz/mL.

Vigor e motilidade espermática (% células móveis): Cada amostra descongelada foi avaliada inicialmente em microscopia ótica em aumento de 200x, observando-se o vigor espermático (TONIOLLI, 1996) e a percentagem de células móveis (MARTIN RILLO *et al.*, 1996b). O conteúdo de cada palheta foi ressuspensão em 2 mL de cada diluente testado (BTS e ACP), com as análises *in vitro* feitas após 10 minutos de incubação a 37 °C.

Morfologia acrossomal e vitalidade espermática: Os exames foram divididos em 2 (dois) tipos de análises: a) integridade do acrossoma (vivos com acrossoma intacto; vivos com acrossoma danificado e mortos) e vitalidade (% de células vivas); b) Análise geral do espermatozoide (cabeça, peça intermediária e flagelo). Foi feito um esfregaço de sêmen, corado pela solução de azul de bromo-fenol (azul de bromo-fenol = 0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada = 10 mL), contando-se 200 células/esfregaço em microscopia ótica com lente de imersão, em aumento de 1000x. Juntou-se uma gota de sêmen (10µL) com outra de corante (10µL), sendo homogeneizada em seguida. Após 30 segundos, procedeu-se ao esfregaço, sendo secado à temperatura ambiente. De cada ejaculado, para cada tratamento, foi realizado

um esfregaço de sêmen após descongelamento e ressuspensão.

Integridade de membrana plasmática: Foi avaliada pela coloração fluorescente em microscopia ótica de campo escuro, utilizando-se uma mistura de corantes biológicos. No preparo do meio de coloração, adicionou-se 20µL da solução estoque de formaldeído, 20µL da solução estoque de diacetato de carboxi-fluoresceína (DIC) e 10µL da solução estoque de iodeto de propídio (IP) para cada mililitro (mL) da solução salina estoque. Um total de 10µL da suspensão de sêmen, contendo 10×10^6 spz/mL foi diluída em 40µL de meio de coloração. Uma alíquota de 5µL da suspensão foi colocada entre lâmina e laminula, sob aumento de 1000x, com iluminação epifluorescente, com filtros de fluoresceína padrão (luz azul) e rodamina padrão (cor verde), alternadamente para os corantes DIC e IP, respectivamente. Foram contadas 200 células por alíquota, classificadas em 3 categorias: I = Membrana íntegra - toda a célula que acumula a DIC (fluorescência verde) ao longo de sua cabeça e flagelo, sem acúmulo da IP (fluorescência vermelha); II = Membrana parcialmente danificada - acúmulo de DIC na peça intermediária e/ou região acrossomal, com cabeça e cauda coradas com IP; III = Membrana danificada - acúmulo apenas de IP ao longo da célula. De cada ejaculado, para

cada tratamento, foi realizado um esfregaço de sêmen.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso, com as análises paramétricas das diferenças entre médias feitas por variância multifatorial usando-se o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03, 1988), com um intervalo de confiança de 5% ($p < 0,05$) e as médias comparadas entre os grupos por meio dos testes de Tukey ou T de Student. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes volumes do diluente gema de ovo

Comparando-se os resultados do vigor espermático (**Figura 1**), nos diluentes ACP e BTS, dentro de cada tratamento, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), independentemente do volume do diluente gema de ovo. Quando analisada a motilidade espermática, o diluente ACP apresentou melhor resultado que o BTS ($p < 0,05$) no T2 (46% e 35%, respectivamente) (**Figura 2**). Possivelmente, isto pode significar uma interação entre os dois diluentes, pois apesar da diminuição da disponibilidade da gema de

ovo para o espermatozoide, o uso do ACP proporcionou uma melhor condição de conservação ao ejaculado.

A gema do ovo tem sido utilizada convencionalmente em meios de criopreservação, tornando-se um importante componente da técnica de criopreservação do sêmen de diferentes espécies animais, incluindo o suíno (BATHAGATE *et al.*, 2006). Entretanto, em relação aos resultados do vigor espermático vistos neste trabalho, quando adicionada ao diluente ACP, não apresentou uma interação que pudesse garantir uma melhor atividade da célula após a descongelação.

É sabido que uma das maiores causas de redução da motilidade após a descongelação é o choque térmico, problema este que pode ser minimizado com a inclusão da gema de ovo ao diluente; ou ainda, dependente também, do tipo de diluente utilizado (WHITE, 1993). Os resultados deste trabalho corroboraram com os daquele autor, uma vez que apresentou uma maior porcentagem de células móveis (46%) no ACP em relação ao BTS (35%) ($p < 0,05$), quando se utilizou a metade do volume do diluente gema de ovo (T2), em relação à técnica de congelação original (controle). Estes resultados estão também de acordo com os achados de Hiray *et al.* (1997), que afirmaram que a gema de ovo tem a desvantagem de não se dissolver

completamente em solução, resultando em um alto conteúdo de fragmentos que podem dificultar a motilidade espermática.

Segundo Ruvalcaba *et al.* (2003), essa diferença pode ser também explicada pela diferença de osmolaridade entre os dois diluentes de ressuspensão, pois a pressão osmótica é importante para manter a qualidade espermática; sendo 350 mOsm o ponto ideal para se manter o espermatozoide mais ativo (MARTIN RILLO *et al.*, 1996a). Apesar de não chegar a este valor, o ACP apresentou uma osmolaridade um pouco mais alta do que a do BTS, o que pode explicar em parte os melhores resultados de motilidade no diluente água de coco em pó.

A **Figura 3-A** mostra resultados significativamente melhores ($p < 0,05$) com o uso do diluente ACP em relação ao BTS, apresentando um maior número de células vivas com acrossoma intacto, em todos os tratamentos. Por outro lado, com relação à integridade de membrana espermática, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados entre o ACP e o BTS. Analisando-se os valores individuais desta característica, foi dentro de T2 que se obteve as maiores porcentagens de espermatozoides com membranas integras, com 32% no ACP e 25% no BTS (**Figura 3-B**). Durante os protocolos de resfriamento do sêmen, detectou-se que as diluições podem causar danos, tanto à motilidade, quanto à

integridade acrossomal (FERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2006). Desta forma, a qualidade do diluente utilizado pode interferir diretamente na viabilidade espermática como pode ser constatado nos resultados deste trabalho. Apesar dos diferentes volumes da gema de ovo, a diluição do sêmen no ACP proporcionou sempre maiores percentuais de células vivas com acrossoma intacto, sugerindo que o uso deste diluente em protocolos de congelamento poderá proporcionar melhores resultados de fertilidade, sendo necessária também a adição da gema de ovo com seu efeito protetor durante o resfriamento, congelamento e após descongelamento do sêmen (GIL *et al.*, 2003).

Diferentes açúcares

Os resultados das análises do vigor espermático, apresentados na **Figura 4**, comparando-se os dois diluentes testados (ACP e BTS) dentro de cada lote, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$). Para a porcentagem de espermatozoides móveis, os resultados foram semelhantes ($p>0,05$) (**Figura 5**). Assim, para as características em questão, tanto o ACP quanto o BTS podem ser usados como diluentes de ressuspensão do sêmen sem interferência significativa nos resultados de conservação.

O efeito ideal de um diluente de sêmen visando sua criopreservação, seria o

de minimizar os danos resultantes dos procedimentos técnicos, viabilizando desta forma a recuperação de um maior número de células móveis e viáveis. A adição de frutose e lactose ao diluente de congelamento, da mesma forma que nos trabalhos de Cardoso *et al.* (2005) com sêmen canino, não conseguiu recuperar uma maior porcentagem de células móveis pós descongelamento, independente do diluente utilizado na ressuspensão do sêmen. Estas duas fontes de energia para o espermatozoide parecem não ser adequadas para esta finalidade. Apesar dos melhores resultados obtidos com a glicose, não houve diferenças significativas entre os diluentes testados, sugerindo ausência de interação entre o diluente e o açúcar.

A **Figura 6-A** mostra que para a categoria espermatozoides vivos com acrossoma intacto, apesar dos valores médios sempre mais altos quando utilizado o diluente ACP em relação ao BTS, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja, não houve influência do tipo de açúcar adicionado ao diluente. Em todos os outros lotes, as diferenças encontradas não foram significativas ($p>0,05$). Por outro lado, quando da análise de integridade de membrana espermática, apenas no T3 (lactose) não houve diferença significativa entre o ACP e o BTS ($p>0,05$). Quando comparados dentro dos outros tratamentos, os

resultados foram sempre melhores nas análises do ACP em relação ao conseguido com o BTS, com os seguintes valores obtidos: T1 = 35,0% e 25,0%; T2 = 23,0% e 12,0%, respectivamente (**Figura 6-B**).

Apesar de não ter sido um resultado comum a todos os lotes, a análise morfológica após a ressuspensão, demonstrou ser o ACP um diluente melhor adaptado às necessidades do sêmen suíno. Entretanto, uma análise ultra-estrutural destas células poderia trazer informações mais detalhadas do que com o uso da microscopia óptica (SILVA *et al.*, 2007b). Desta forma, poderia ter sido colocado de forma mais evidente os bons resultados obtidos com o uso do ACP, uma vez que mudanças estruturais e funcionais dos espermatozoides causadas durante os procedimentos de criopreservação poderiam explicar problemas de redução da fertilidade (RUVALCABA *et al.*, 2003) além da maior sensibilidade do espermatozoide suíno ao choque térmico (ANTUNES *et al.*, 2007).

Diferentes crioprotetores

Os resultados do vigor espermático, apresentados na **Figura 7**, comparando-se os dois diluentes testados (ACP e BTS) dentro de cada lote, não apresentaram nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$). Para a percentagem de espermatozoides móveis, os resultados não apresentaram diferenças entre

os dois diluentes utilizados, ($p > 0,05$) nos diferentes lotes (**Figura 8**). Desta forma, para as características acima, tanto o ACP quanto o BTS podem ser usados para a ressuspensão do sêmen suíno após descongelação.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças entre os tratamentos, houve uma acentuada queda dos valores de motilidade espermática, que podem ser, ao menos em parte, explicadas pela ação de substâncias inibitórias da respiração celular presentes na gema de ovo do diluente de congelação (HOLT, 2000). Estudos com a adição de mais de um crioprotetor ao diluente (glicerol e etileno-glicol) demonstraram que houve um estímulo aos resultados de motilidade dos espermatozoides (BIANCHI *et al.*, 2006); devendo entretanto ser testado e comparado entre diferentes diluentes para o sêmen suíno. Apesar de muitos estudos na área, o processo de resfriamento e congelação provocou uma queda do vigor e da motilidade em todos os tratamentos, corroborando os resultados de Blume *et al.* (2007).

A **Figura 9-A** apresenta resultados significativamente melhores ($p < 0,05$) para a característica espermatozoides vivos com acrossoma intacto, quando utilizados os tratamentos 2 e 3 no diluente ACP (36,0% e 35,0%, respectivamente), em relação ao BTS (27,0% e 26,0%, respectivamente). Quando usado o glicerol (T1), não houve diferenças

entre o ACP e o BTS ($p>0,05$). Aparentemente, houve uma interação entre o tipo de crioprotetor e o diluente, fato este que deve ser considerado na hora da escolha do diluente a ser utilizado. É conhecido que o etileno glicol tem uma melhor performance que o glicerol; entretanto, necessário se faz chegar-se a uma concentração ótima do mesmo (GARG e PUROHIT, 2007), bem como comparar possíveis diferenças de resultados em relação a cada diluente utilizado. Analisando-se a integridade da membrana espermática, em todos os tratamentos, as diferenças entre os resultados obtidos foram sempre significativas entre os dois diluentes utilizados ($p>0,05$). Quando comparados, os resultados foram sempre melhores, quando usado o ACP (T1 = 19,0%; T2 = 19,0%; T3 = 16,0%) em relação ao BTS

(T1 = 5,0%; T2 = 2,0%; T3 = 3,0%) (Figura 9-B).

Ao longo do tempo, diferentes pesquisas têm sido objeto de estudos do efeito das mudanças de temperatura e de diferentes soluções, como causas de danos e morte celular nos protocolos de congelamento (MAZUR, 1970; KARROW e CRITSER, 1997; FULLER *et al.*, 2004). Desta forma, a importância de uma melhor compreensão da ação do tipo de diluente utilizado no sêmen descongelado ficou mais evidente para a preservação da integridade de membrana espermática, reforçada pelos resultados obtidos com o uso do ACP.

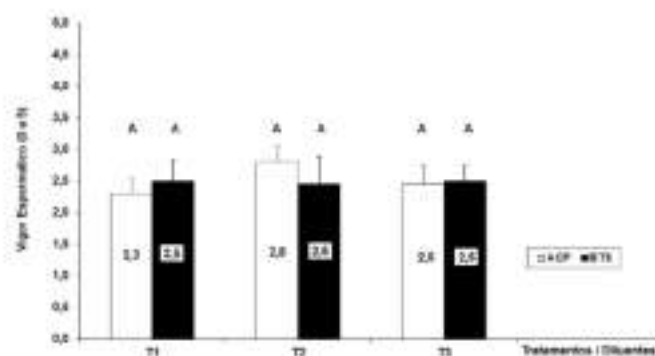


Figura 01: Vigor espermático do sêmen suíno criopreservado, em diferentes volumes do diluente gema de ovo, analisado após descongelamento e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=18mL; T2=9mL; T3=6mL)

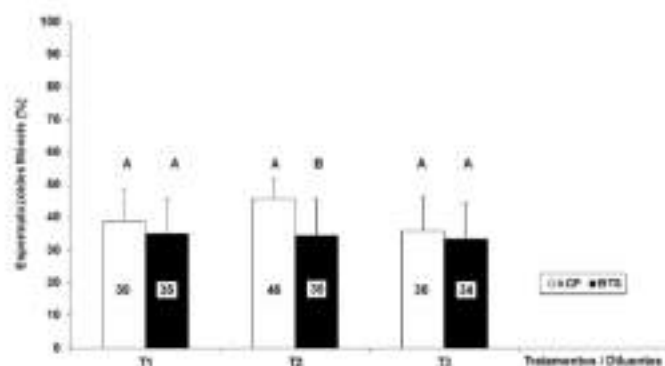


Figura 02: Motilidade espermática (%), do sêmen suíno criopreservado, em diferentes volumes do diluente gema de ovo, analisada após descongelação e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=18mL; T2=9mL; T3=6mL.)

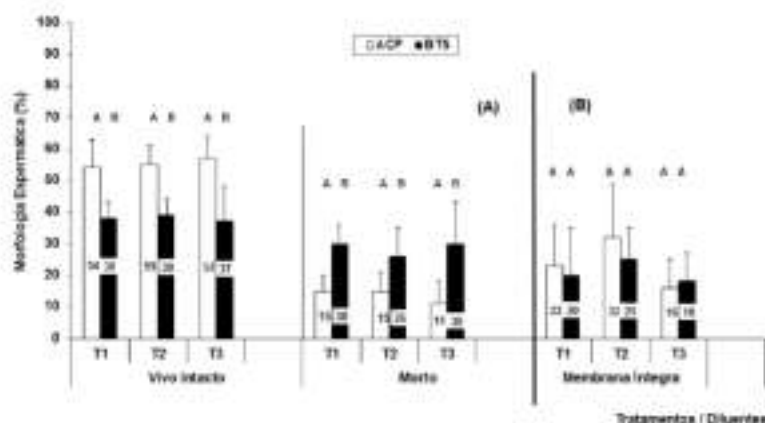


Figura 03: Morfologia acrossomal, vitalidade e integridade de membrana plasmática do espermatozoide suíno criopreservado, em diferentes volumes do diluente gema de ovo, analisados após descongelação e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=18mL; T2=9mL; T3=6mL.)

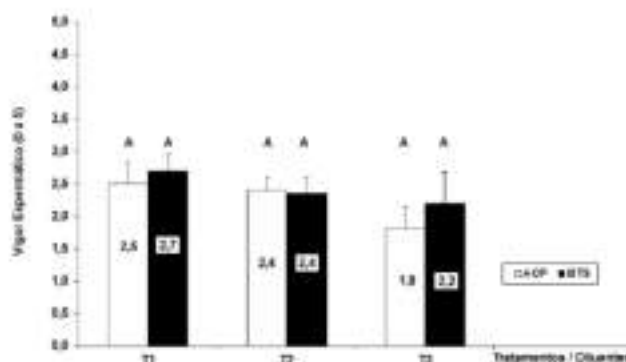


Figura 4: Vigor Espermático do sêmen suíno criopreservado, em diferentes açúcares adicionados ao diluente gema de ovo, analisado após descongelação e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=glicose; T2=frutose; T3=lactose)

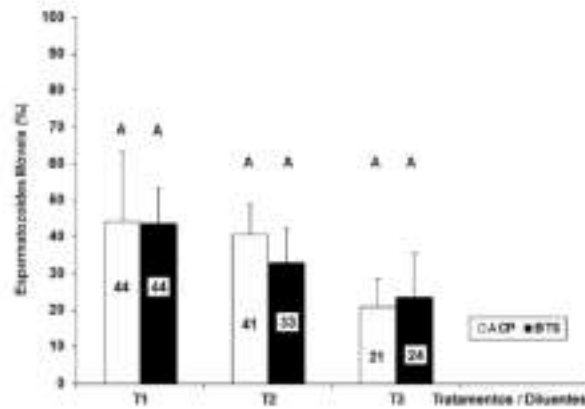


Figura 5: Motilidade espermática, do sêmen suíno criopreservado, em diferentes açúcares adicionados ao diluente gema de ovo, analisada após descongelação e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=glicose; T2=frutose; T3=lactose)

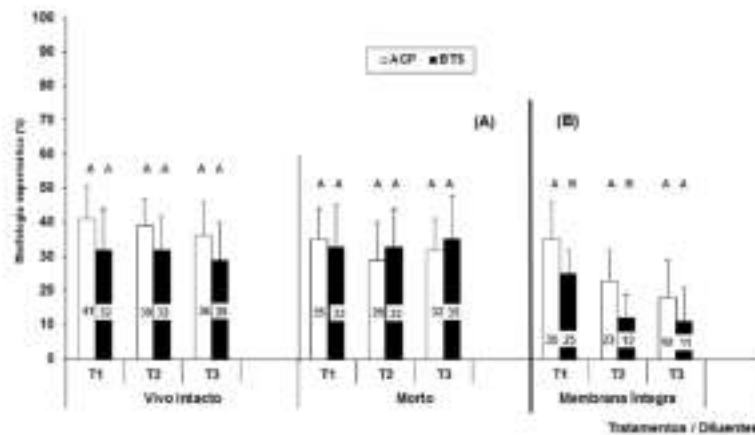


Figura 6: Morfologia acrossomal, vitalidade e integridade de membrana plasmática, do sêmen suíno criopreservado, em diferentes açúcares adicionados ao diluente gema de ovo, analisados após descongelação e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=glicose; T2=frutose; T3=lactose)

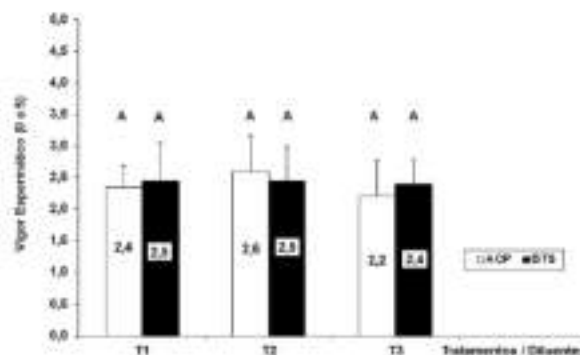


Figura 7: Vigor espermático do sêmen suíno criopreservado, em diferentes crioprotetores adicionados ao diluente gema de ovo, analisado após descongelação e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=glicerol; T2=etilenoalcol; T3=propilenoalcol)

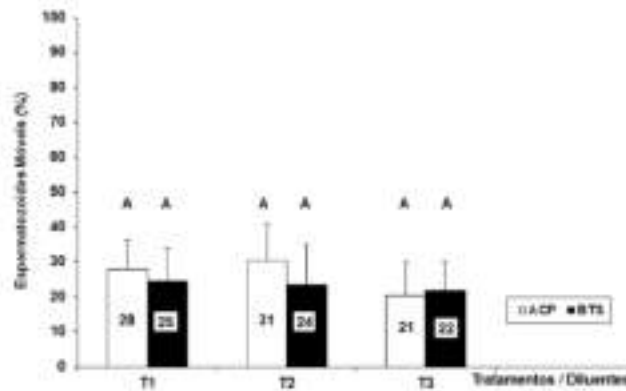


Figura 8: Motilidade espermática do sêmen suíno criopreservado, em diferentes crioprotetores adicionados ao diluente gema de ovo, analisada após descongelamento e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=glicerol; T2=etilenoglicol; T3=propilenoglicol)

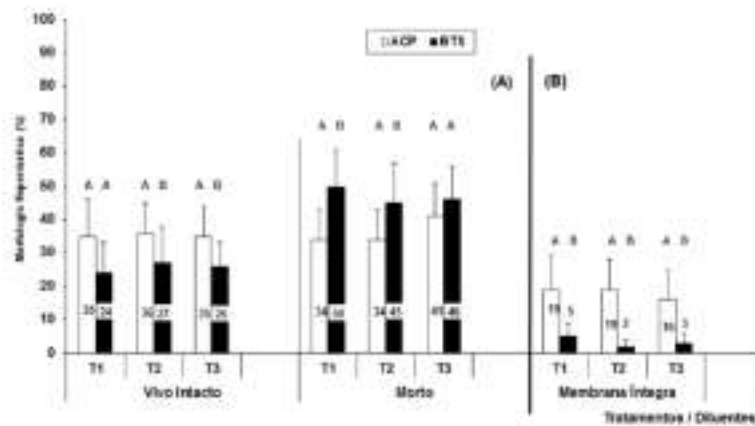


Figura 9: Morfologia acrossomal, vitalidade e integridade de membrana plasmática, do sêmen suíno criopreservado, em diferentes crioprotetores adicionados ao diluente gema de ovo, analisados após descongelamento e ressuspensão nos diluentes ACP e BTS. (T1=glicerol; T2=etilenoglicol; T3=propilenoglicol)

CONCLUSÕES

A relação entre diluente e espermatozoides é um fator importante que pode influenciar na qualidade do sêmen descongelado, devendo ser melhor determinada para o ejaculado do varrão. Em diferentes aspectos analisados, o diluente

água de coco desidratada (ACP-103[®]), superou os resultados obtidos com o uso do BTS, sugerindo apresentar uma melhor capacidade de conservação da célula espermática suína durante o processo de congelamento e abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de uma técnica ideal de criopreservação para o sêmen suíno.

Entretanto, novas pesquisas devem ser realizadas no sentido de se determinar qual a melhor relação diluente/espermatozoide, bem como explorar mais intensamente as reais possibilidades do diluente ACP na técnica de criopreservação do sêmen do varrão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ajuda do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, à Granja Suinícola Estiva por ceder os animais e instalações e ao Dr José Ferreira Nunes do NIB/UECE pelo fornecimento da ACP-103[®], sem os quais esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ARAÚJO, L.L.; OLIVEIRA, K.G.; LIMA, J.S.; PANTOJA, P.S.P.; ARAÚJO, J.B.; DOMINGUES, S.F.S. Preservação de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37 °C. In: *Resumo do 17º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Curitiba, v.17, p.192, 2007.

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. In: *Resumo do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Curitiba, v.17, p.177, 2007.

BATHGATE, R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.68-73, 2006.

BIANCHI I.; CALDERAM, K.; MADEIRA, E.M.; MASCHIO, E.F.; CORRÊA, E.K.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Crioprotetores intra e extracelulares utilizados no congelamento do sêmen suíno. *Suinocultura Industrial*, n.9, p.32-36, 2006.

BLUME, H.; MONDADORI, R.G.; SNEL-OLIVEIRA, M.V.; BORGES, P.H.R.; PINTO, C.A.S.; FERRAZ, C.N. Efeito de diferentes concentrações de glicerol na criopreservação de sêmen de cães. In: *Resumo do 17º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Curitiba, CBRA, v.17, p.179, 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.

CRABO, B.G.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v.12, p.125-127, 1971.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal

- spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.114-118, 2006.
- FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. *Life in the frozen state*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
- GARG, N.; PUROHIT, G.N. Effect of different cryoprotectant concentrations for ultrarapid freezing of immature goat follicular oocytes on their subsequent maturation and fertilization in vitro. *Animal Reproduction*, v.4, n.3/4, p.113-118, 2007.
- GRAHAN, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKI-LAURILA, M.; BOWER, R.E. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen. *Artificial Insemination Digest*, v.19, n.2, p.12-14, 1971.
- GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in RAM semen. *Theriogenology*, v.59, p.1241-1255, 2003.
- HIRAI, M.; CERBITO, W.A.; WIJALAGUNAWARDANE, M.P.B.; BRAUN, J.; LEIDL, W.; OHOSAKI, K.; MATSUZAWA, T.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bullspermatozoa. *Theriogenology*, v.47, p.1463-1478, 1997.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.3-22, 2000.
- 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.
- KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. *Reproductive tissue banking*. San Diego, CA: Academic Press, 1997.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v.17, p.74-82, 1976a.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. influence of thawing diluents and of boars. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v.17, p.43-62, 1976b.
- MARTÍN RILLO, S.; PINTADO, B.; ALBA, C.; SÁNCHEZ, R.; GARCÍA, P.; CORCUERA, D.; ARTIGA, C.; SAGÜES, A.; DÍAZ, C.; SÁIZ, F.; PEREZ, M.C. Effect of cooled and frozen boar semen on embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.309-310, 1996a.
- MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.519-526, 1996b.
- MAZUR, P. The freezing of biological system. *Science*, v.168, p.939-949, 1970.
- PAQUIGNON, M. Semen technology in the pig. *Currents Topics on Veterinary Medicine Animal Science*, v.30, p.202-218, 1984.
- PAQUIGNON, M.; COUROT, M.; DU MESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude *in vitro*. *Journées Recherche Porcine en France*, p.71-76, 1974.
- PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, J.; BARITEAU, J.; DACHEUX, J.L.; COUROT, M. Effet du dilueur, du taux de dilution et du plasma séminal sur la fertilité des truies après une longue conservation de la semence. *Journées Recherche Porcine en France*, v.14, p.85-90, 1982.

- PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. *Journal of Biological Chemistry*, v.130, p.415, 1939.
- POLGE, C.; SALAMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical inseminations. *Veterinary Record*, v.87, p.424-428, 1970.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Fertility with frozen boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v.33, n.267, p.265, 1971.
- ROBERTSON, L.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. The effect of incubation on membrane injury and calcium movement in ram spermatozoa subjected to cold shock. In: *Abstract do 11th International Congress in Animal Science and Artificial Inseminations*, Dublin, v.1, p.290, 1988.
- 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.
- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, R.V.; PARENTE, J.C.B.; CAVALCANTE, J.M.M.; MELLO, M.M.C.; BRASIL, O.O.; FAUSTINO, L.R.; GONÇALVES, R.F.B.; BATISTA, C.A.P.M.; SOUZA, D.F.R.; ACCIOLY, M.P. 2007. Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102[®] ou TRIS, resfriado e mantido a 4 °C por 24 horas. In: *Resumo do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Curitiba, v.17, p.149.
- SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field from its use. *Journal of Dairy Science*, v.24, p.905-910, 1941.
- SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINES, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.
- SAS Statistical Analysis System. v.6.03 Cary; SAS Institute, 1988. 1028p.
- SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S.; MEINKE, W.; FREITAS, A.R. Eficiência à campo do sêmen suíno congelado. *Comunicado Técnico EMBRAPA-CNPSA*, v.46, p.1-3, 1982.
- SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. *Suínos & Cia*, v.1, n.1, p.25-28, 2002.
- SCOBEY, M.J.; BIELFELD, J.S.; KRUSSEL, J.S.; JEYENDRAN, R.S. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. *Andrologia*, v.27, p.229-231, 1995.
- 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 gato doméstico. In: *Resumo do 17^o Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Curitiba, v.17, p.191, 2007a.
- SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Descrição de danos ultra-estruturais em espermatozoides caninos criopreservados. In: *Resumo do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Curitiba, v.17, p.168, 2007b.

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

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

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; MAGISTRINI, M.; COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15 °C of boar semen for artificial insemination. *Reproduction Nutrition and Development*, v.36, p.503-511, 1996.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility and Development*, v.5, p.639-658, 1993.