

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Avaliação da dimetilacetamida e do glicerol na
criopreservação do sêmen de suínos através
de testes de fertilização *in vitro***

G I S S E L E R A M B O

Pelotas, 2008

GISSELE RAMBO

**Avaliação da dimetilacetamida e do glicerol na
criopreservação do sêmen de suínos através de testes
de fertilização *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador:

João Carlos Deschamps, PhD

Profº Titular, Faculdade de Veterinária, UFPEL

Co-Orientadores:

Thomaz Lucia Jr., PhD

Profº Adjunto, Faculdade de Veterinária UFPEL

Maria Gabriela T. Rheingantz, Drª

Profª Adjunta, Instituto de Biologia, UFPEL

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

R167a Rambo, Gissele

Avaliação da dimetilacetamida e do glicerol na criopreservação do sêmen de suínos através de testes de fertilização in vitro / Gissele Rambo. Pelotas, 2009.
50f. : tab

Dissertação (Mestrado em reprodução Animal) –
Programa de Pós-Graduação em Veterinária.
Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, João Carlos Deschamps, Orientador; co-orientadores Thomaz Lucia e Maria Gabriela T. Rheingantz.

1. Suínos 2.Sêmen congelado 3.Crioprotetores

BANCA EXAMINADORA

João Carlos Deschamps, PhD

Prof° Titular, Faculdade de Veterinária, UFPEL (Orientador)

Thomaz Lucia Jr., PhD

Prof° Adjunto, Faculdade de Veterinária, UFPEL

Maria Gabriela T. s Rheingantz, Dr^a

Prof^a Adjunta, Instituto de Biologia, UFPEL

Ivan Bianchi, Dr

Prof° Adjunto, Faculdade de Veterinária, UFPEL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a felicidade de ter em meu coração os meus sonhos, meus amores e amigos nesse tempo todo de caminhada.

Esse trabalho também dedica aos mestres que além de iluminarem meus passos foram de um poder grandioso, me guiando nessa construção, obrigada por terem trabalhado tão arduamente em meu benefício, vocês são e sempre serão nobres para mim.

Obrigada meu orientador Professor Dr. João Carlos Deschamps, dedico-lhe minha admiração pelo profissional que questiona o que alcançamos juntos. Ao professor incansável em apontar o caminho. A pessoa que mesmo contrariada me permitiu alcançar a LUZ PRÓPRIA do meu jeito. Obrigado por estar ao meu lado quando os problemas me desestabilizaram. Em especial, Prof. Deschamps, agradeço-lhe pela confiança e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, minha carreira na universidade se deve em grande parte a sua preocupação e acompanhamento, ao seu zelo pelo meu desenvolvimento.

Aos meus Pais e Irmão, nas tantas vezes que sofri de saudade foi por ter motivos. Pai e Mãe, nas tantas vezes que querendo voltar não me admitiram desistir, foi pelos sonhos que vocês viveram sob os meus olhos, fui até onde o amor de vocês me acompanhou obrigada.

Ao meu querido José, tanta saudade, tantos sonhos, você é o companheiro ideal, obrigada.

Ao Frigorífico Castro, e todos os seus colaboradores, uma escola de vida, obrigada por me deixarem entrar no trabalho de vocês, obrigada por estarem presentes e tornarem-se colegas no meu ideal de produzir embriões *in vitro* a partir das “bolinhas” que retiramos das carcaças.

Aos amigos Dr. Milton, Dr. Thomaz, Dra. Gabriela, Dra. Ligia, Dr. Aleixo e Alegani, pela amizade, carinho, incentivo e auxílio.

Aos amigos e colegas de Pós-graduação Elisa, Priscila, Carine, Rafael, Guilherme e Karina pelas discussões técnicas e auxílio na execução deste trabalho.

Aos estagiários do grupo PIGPel, Rudy, Fernando, Kérlim e Éder, pelo auxílio e dedicação exemplares no desenvolvimento desse trabalho, tive muita sorte em contar com vocês.

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

Aos colegas de laboratório, Raquel, Gustavo, Cristian, Vinicius, Thiago e Marta pela valiosa ajuda no experimento.

Aos laboratórios do Centro de Biotecnologia (CENBIOT), pela disponibilidade, explicações, infra-estrutura e materiais na realização do trabalho, assim como aos professores e funcionários do Centro de Biotecnologia e da Faculdade de Veterinária, pelo apoio e dedicação.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo

RAMBO, Gissele. **Avaliação da dimetilacetamida e do glicerol na criopreservação do sêmen de suínos através de testes de fertilização *in vitro***. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A avaliação da eficiência da criopreservação do sêmen é uma importante ferramenta para viabilizar o uso de sêmen congelado na inseminação artificial em suínos. Um experimento foi realizado a fim de identificar qual crioprotetor interno (dimetilacetamida-DMA ou glicerol) seria associado com melhores indicadores de qualidade seminal pós-descongelamento e fertilidade *in vitro* com sêmen suíno congelado. A fração espermática rica em espermatozóides de 28 ejaculados provenientes de quatro machos foi congelada com DMA ou glicerol. Para estimar o sucesso da criopreservação do sêmen foram utilizados parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento, teste de penetração *in vitro* (TPIV) de ovócitos suínos e produção *in vitro* de embriões. Para amostras congeladas com DMA, a motilidade (38,1%) e a integridade da membrana espermática (39,9%) foram superiores ($P < 0,05$) às observadas com glicerol (21,9% e 13,0%, respectivamente). A taxa de TPIV e o número de espermatozóides por ovócito também foram superiores ($P < 0,05$) para a DMA (27,9% e 29,2, respectivamente) do que para o glicerol (13,6% e 20,7, respectivamente). A taxa de clivagem alcançada com a DMA (13,0%) foi similar ($P > 0,05$) à obtida com glicerol (15,6%). A taxa de desenvolvimento embrionário não diferiu ($P > 0,05$) entre DMA e glicerol (15,8% e 22,0%, respectivamente). Portanto, considerando o conjunto de todos os testes, em comparação com o glicerol, a DMA foi associada com melhores indicadores de qualidade seminal e fertilidade *in vitro*.

Palavras-chaves: sêmen congelado, crioprotetores, penetração ovocitária, desenvolvimento embrionário, suínos.

Abstract

RAMBO, Gissele. **Evaluation of dimethylacetamide and glycerol on cryopreservation of boar semen through in vitro fertilization tests.** 2008. 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The evaluation of the efficiency of semen cryopreservation is critical to make the use of frozen semen feasible in artificial insemination programs in swine. This study compared the efficiency of two non-penetrating cryoprotectants (dimetilacetamide-DMA or glycerol) on parameters of post-thawing semen quality and *in vitro* fertility with frozen swine semen. The sperm-rich fractions of 28 ejaculates from four boars were frozen with either DMA or glycerol. The efficiency of semen freezing was evaluated through parameters of post-thawing semen quality and *in vitro* penetration (IVP) of swine oocytes and embryo production. For samples frozen with DMA, sperm motility (38.1%) and membrane integrity (39.9%) were greater ($P < 0.05$) than those for glycerol (21.9% and 13.0%, respectively). Both the IVP rate and the number of spermatozoa per oocyte were greater ($P < 0.05$) for DMA (27.9% and 29.2, respectively) than for glycerol (13.6% and 20.7, respectively). The cleavage rate with DMA and glycerol samples (13.0% and 15.6%, respectively) were similar ($P > 0.05$). The embryo development rate did not differ ($P < 0.05$) for DMA (15.8%) and glycerol (22.0%). Therefore, when compared to glycerol, DMA was associated with improved post-thawing semen quality and *in vitro* fertility.

Key-words: frozen semen, cryoprotectants, oocyte penetration, embryo development, swine.

Sumário

Banca Examinadora	04
Agradecimentos	05
Resumo	07
Abstract	08
Sumário	09
Capítulo I: Revisão de literatura	11
<i>Criopreservação de sêmen suíno</i>	11
<i>Fatores relacionados ao protocolo de criopreservação</i>	11
<i>Fatores não relacionados ao protocolo de criopreservação</i>	14
<i>Avaliação de sêmen congelado-descongelado</i>	15
<i>Avaliação espermática</i>	17
Capítulo II: Avaliação da dimetilacetamida e do Glicerol na criopreservação de sêmen suíno através de testes de fertilização <i>in vitro</i>	21
Introdução	21
Materiais e Métodos	24
<i>Coleta do sêmen</i>	24
<i>Processo de criopreservação do sêmen</i>	24
<i>Processo de descongelamento do sêmen</i>	25

	10
<i>Avaliação da qualidade espermática</i>	26
<i>Motilidade e morfologia</i>	26
<i>Avaliação da integridade de membrana plasmática</i>	26
<i>Testes de fertilização in vitro</i>	27
<i>Teste de penetração in vitro</i>	27
<i>Produção in vitro de embriões</i>	29
Análise estatística	30
Resultados	31
Discussão	35
Conclusões	40
Referências	41

Capítulo I: REVISÃO DE LITERATURA

1. Criopreservação de sêmen suíno

Os danos causados pela criopreservação nas células espermáticas de suínos resultam na redução no número de leitões nascidos por leitegada e na taxa de parição, além de requerer uma concentração de espermatozoides duas a três vezes maior por dose inseminante quando utilizadas na inseminação artificial (IA) de fêmeas (Johnson, 1985; Wagner & Thibier, 2000). Essas perdas na fertilidade resultantes da criopreservação dos espermatozoides suíno são atribuídas a vários fatores. Além dos crioprotetores, fatores relacionados ao protocolo de congelamento tais como: temperatura de criopreservação, estresse osmótico e tóxico e formação e dissolução de cristais de gelo, que ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento, são responsáveis, em parte, pelos baixos índices de fertilidade alcançados *in vivo*. Fatores não relacionados ao processo de criopreservação dos espermatozoides entre eles os fatores associados ao macho e à fêmea, bem como aos processos relacionadas à IA também contribuem para a baixa fertilidade,.

É objetivo desta revisão abordar os métodos *in vitro* utilizados para verificar o efeito do processo de criopreservação sobre a integridade morfológica e funcional das células espermáticas.

1.2. Fatores relacionados ao protocolo de criopreservação

A mudança brusca na temperatura utilizada durante o processo de criopreservação causa o chamado choque térmico, que é um stress térmico com efeito negativo sobre a membrana da célula, provavelmente relacionado a mudança de fase dos lipídios constituintes da membrana (Watson 2000). No

sêmen suíno esse fenômeno é mais manifestado imediatamente após a ejaculação, mas as células tornam-se progressivamente menos sensíveis com o passar de poucas horas (Pursel *et al.*, 1972), sendo que a mudança ocorre no intervalo de temperatura entre 5 e 15 °C (Drobnis *et al.*, 1993), considerada, portanto, como a principal passagem de temperatura responsável para a ocorrência das injúrias termo-dependentes. Segundo De Leeuw *et al.* (1990), durante e após o congelamento, ocorrem eventos de separação de fase das membranas, os quais são parcialmente revertidos após o descongelamento.

Outros elementos que fazem parte das membranas são também alterados pela temperatura, como as proteínas integrais, que são aglomeradas na fase de separação dos lipídios. Dessa forma, é esperada a alteração na função dessas proteínas, como as proteínas canais de íons as quais perdem parte da capacidade de modulação, de forma que sua atividade fica alterada. Porém, como efeito do congelamento/descongelamento a permeabilidade das membranas aumenta (Robertson & Watson, 1986), e a regulação de cálcio é alterada, interferindo na função e na antecipação da capacitação espermática.

Outros fatores que causam às membranas substanciais e rápidas trocas e estresse osmótico são a adição e remoção dos crioprotetores. O estresse osmótico depende do tipo de crioprotetor, bem como da concentração e da temperatura de adição do mesmo, e do tempo de exposição pré-congelamento.

Para o congelamento de sêmen são utilizados crioprotetores intracelulares e extracelulares, cuja finalidade é proteger a célula espermática das lesões provocadas pelo congelamento e descongelamento celular (Karow, 2001). Os crioprotetores comumente utilizados são o glicerol (intracelular) e a gema de ovo (extracelular). Estudos sobre o mecanismo de proteção da gema de ovo e do leite realizados por Bergeron & Manjunath (2006), concluíram que uma família de lipídios ligados a proteínas presentes no plasma seminal, denominadas de *bovine sperm proteins* (BSP), induzem a remoção de colesterol e fosfolipídios da membrana espermática, afetando as células espermáticas. As BSPs interagem com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) presente na gema de ovo, minimizando a remoção de lipídios da membrana do espermatozóide, o que influencia positivamente a armazenagem em estado líquido ou congelado do sêmen. Além de melhorar a motilidade (Moussa *et al.*, 2002), a LDL aumenta a resistência espermática contra o choque térmico, a

integridade do acrossoma e da membrana plasmática (Hu *et al.*, 2006). A LDL também protege o DNA dos espermatozoides suínos dos danos causados pela criopreservação (Jiang *et al.* 2007). O leite desnatado também protege a célula espermática, sendo que o mecanismo de proteção envolve a interação das BSPs com as micelas de caseína (Bergeron & Manjunath, 2006).

Em eqüinos, estudos com a utilização de crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos com obtenção de bons resultados, através do uso de diferentes amidas (Medeiros *et al.*, 2002; Vidament *et al.*, 2002). A dimetilacetamida (DMA) é um crioprotetor largamente utilizado nos protocolos de criopreservação de espermatozoides de peixes (Cabrita *et al.*, 1998; Ogier de Baulny *et al.*, 1999) e de aves (Tselutin *et al.*, 1999), trazendo benefícios a estas espécies na resposta pós-descongelamento. Modificações nos processos de criopreservação, através da redução do tempo de processamento, temperatura e tempo de descongelamento, e da utilização de amidas como crioprotetor intracelular, foram realizados por Bianchi *et al.* (2008a), o que poderá contribuir para o maior conhecimento dos efeitos dos crioprotetores na criopreservação. A formação de cristais de gelo, acompanhada da pressão osmótica e da mudança química no interior da célula, são efeitos associados ao congelamento, à desidratação, e também ao descongelamento (Peña *et al.*, 2003). O estresse induzido pela formação de cristais de gelo é principalmente associado com mudanças na pressão osmótica na fração não congelada (Watson & Duncan, 1988). Quando a solução é congelada abaixo do ponto de congelamento, os cristais de gelo são nucleados e a água pura cristaliza. Os solutos são dissolvidos na fração restante de água e a força osmótica da solução se eleva. É reconhecido que a duração da exposição em cada evento pode ser minimizada para melhorar a sobrevivência das células, onde a taxa de congelamento seja rápida, e os cristais de gelo formados sejam menores. Entretanto, a taxa de congelamento pode ser suficientemente lenta para permitir que a água deixe a célula por osmose prevenindo a formação intracelular de gelo, que é letal. Quando a pressão osmótica se eleva as membranas ainda precisam responder a passagem da água, e as proteínas que permitem essa passagem provavelmente estão com sua função alterada, ou seja, se o momento não for suficiente para permitir a saída e entrada de

líquidos, a membrana pode ser danificada pelo influxo de crioprotetor ou efluxo de água (Karow, 2001).

As alterações provocadas durante o processo de criopreservação implicam em efeitos negativos sobre a motilidade espermática e sobre as trocas metabólicas através das membranas da célula. Essas alterações parecem influenciar negativamente os processos de capacitação espermática e a fertilização (Nardid *et al.*, 1997), podendo levar à morte celular (De Leeuw *et al.*, 1991).

Os efeitos da criopreservação sobre as células resultam na combinação de perdas sobre a viabilidade dos espermatozóides e na diminuição da funcionalidade da população sobrevivente. Cerca de 50% dos espermatozóides não sobrevive à criopreservação, porém, mesmo que a perda de células seja compensada com uso de alta concentração na dose inseminante, os resultados dependem de uma série de fatores não relacionados com o protocolo de congelamento.

1.3. Fatores não relacionados ao protocolo de criopreservação

Fatores que não são relacionados ao protocolo de congelamento têm efeito sobre a fertilidade do sêmen congelado, esses fatores são atribuídos ao macho, à fêmea e às condições da inseminação.

Diferenças na qualidade do sêmen pós-congelamento, entre machos e entre as porções do ejaculado, foram detectadas por Peña *et al.* (2006). Esses mesmos autores identificaram machos que mostravam melhores resultados ao congelamento na primeira porção do ejaculado e, em outros machos, os melhores resultados foram observados na segunda porção do ejaculado. O plasma seminal serve para carrear o sêmen pelo trato genital feminino e tem sido descrito possuir tanto efeito benéfico ou prejudicial aos espermatozóides. Baas *et al.* (1983) descreveram que as proteínas presentes no plasma seminal de bovinos têm relação com a motilidade e viabilidade, e são associadas com a fertilidade (Killian *et al.*, 1993) ou facilitam a capacitação espermática (Miller *et al.*, 1990). Entretanto, a presença do plasma seminal parece ser danosa à armazenagem do sêmen de bovinos e eqüinos (Way *et al.*, 2000; Bergeron *et al.*, 2004) ou à criopreservação (Moore *et al.*, 2005). Bergeron & Manjunath

(2006) identificaram uma família de fosfolipídios ligando proteínas (BSP) presentes no plasma seminal de bovinos, as quais são prejudiciais à preservação, pois induzem o efluxo de lipídios da membrana do espermatozóide, sendo que esses fatores estão presentes também em quantidade significativa no plasma seminal de suínos estudados.

Alguns fatores que influenciam a fertilidade são associados à fêmea (Clark *et al.*, 1989; Hammerstedt, 1996), bem como às condições da inseminação (Foote; 2003).

A ovulação das fêmeas suínas pode ocorrer por um período extenso do estro, de forma que os espermatozóides têm que sobreviver mais de 40 h no oviduto, porém, o sêmen congelado-descongelado tem período de vida restrito. Waberski *et al.* (1994) demonstraram que quando a inseminação com sêmen congelado for realizada em um período de 4 h antes da ovulação a fertilidade pode ser alta.

1.4. Avaliação de sêmen congelado-descongelado

Avaliações *in vitro* de sêmen congelado-descongelado visam verificar o efeito da técnica de criopreservação nas diferentes estruturas espermáticas e funções. Avaliações de motilidade espermática e integridade de membrana, imediatamente após o descongelamento, são as mais utilizadas, seguidas de avaliação da morfologia espermática.

A avaliação de motilidade é o teste mais usado por ser simples, rápido e de baixo custo. É um bom indicador de membranas intactas e funcionais (Xu *et al.*, 1998).

Segundo Harrison (1997) a membrana plasmática intacta é um pré-requisito para garantir o metabolismo espermático e a função espermática. Os diferentes métodos para a avaliação da membrana plasmática incluem corante com eosina-nigrosina e corantes fluorescentes (iodeto de propidium, diacetato carboxifluoresceína, Hoescct 33258 e outros). Entretanto, a informação sobre a estrutura da membrana não é sempre relacionada com a fertilidade (Gadea *et al.*, 1998), talvez por permitir informação sobre a viabilidade do espermatozóide apenas e não sobre sua funcionalidade.

Outros métodos podem ser usados para estimar a fertilidade baseados

em avaliações *in vitro* de características físicas motilidade e vigor. Contudo estudos tem demonstrado que o uso de ejaculados com características superiores não necessariamente mostram ótima performance reprodutiva. O que indica que essas características não necessariamente são associadas a fertilidade (Xu *et al.*, 1998). Mesmo que essas avaliações permitam evidenciar o resultado do congelamento sobre as células, não asseguram uma acurada estimativa da fertilidade (Gadea, 2005; Macedo *et al.*, 2006).

Apesar dos resultados contraditórios descritos acima não se deve omitir o conhecimento do número de células móveis, bem como a condição da membrana em uma amostra de sêmen, devendo por outro lado associar-se esses resultados a outras avaliações espermáticas a fim de melhor predizer a viabilidade das células avaliadas.

A habilidade de fertilizar é comumente medida como o percentual de fêmeas que concebem ou que pariram após serem submetidas a IA (Foote; 2003). Com algumas limitações essa medida é indicativa da eficiência com que oócitos são fertilizados por espermatozóides e são capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário (Watson, 1996). A forma mais consistente de se verificar a fertilidade de um ejaculado é obter, a partir desse ejaculado, gestação viável e leitegada numerosa após a IA. Porém, testes *in vivo* acabam sendo imprecisos devido à alta variabilidade associada à fêmea (Hammerstedt, 1996) e as condições da IA (Foote; 2003). Exemplos dessa variação são: assincronia entre o momento da ovulação e da IA e a concentração espermática utilizada na dose inseminante.

Testes relacionados a fatores espermáticos têm sido desenvolvidos e/ou aperfeiçoados para sêmen suíno, mas na maioria desses testes, a relação com a fertilidade tem relativamente baixa significância (Johnson *et al.*, 2000; Flowers, 2002; Rodriguez-Martinez, 2003), devido em grande parte aos muitos fatores envolvidos com o processo de fertilização (Foote, 2003), a fertilidade das fêmeas (Clark *et al.*, 1989), condições da inseminação (Foote, 2003) e metodologia usada, uma vez que as condições experimentais não obedecem à regularidade de protocolo (Ivanova & Mollova, 1993; Martínez *et al.*, 1993).

A busca pela fertilidade com base nos fatores relacionados aos espermatozóides é objeto da maioria dos estudos, porém, devido ao fato da relação biológica entre essas duas variáveis nem sempre ser verificada, testes

focados na funcionalidade da célula espermática têm sido desenvolvidos.

1.4.1. Avaliação espermática

Os métodos clássicos de avaliação seminal incluem volume do ejaculado, concentração espermática, número total de espermatozoides no ejaculado, motilidade progressiva, integridade de membrana e morfologia (Corrêa *et al.*, 2001). A relação entre esses métodos de avaliação e a fertilidade é usualmente contraditória (Xu *et al.*, 1998; Tardif *et al.*, 1999; Selles *et al.*, 2003) e insuficiente para prever a fertilidade (taxa de parição e número de leitões nascidos) (Gadea *et al.*, 1998). Porém, tem importância quando o foco do estudo é a produção espermática, especialmente em estudos patológicos onde a função testicular tem clara relação com a fertilidade reduzida (Gadea *et al.*, 1998; Gadea *et al.*, 2004).

Uma vez reconhecido que os testes convencionais de avaliação seminal não permitem um diagnóstico preciso sobre a fertilidade do sêmen, novos testes visando avaliar a capacidade funcional do sêmen têm sido desenvolvidos, principalmente na determinação da habilidade do espermatozoide de capacitar e fertilizar.

A avaliação da penetração oocitária *in vitro* é um método alternativo considerado mais preciso por mimetizar todos os estágios de penetração *in vivo* (Martinez *et al.*, 1993). A maior limitação desse método é requerer equipe altamente treinada e equipamento de CO₂. Porém conforme descrito por Macedo *et al* 2006 é possível a realização do teste de penetração oocitária *in vitro* para estimar a fertilidade de sêmen suíno mantido sob refrigeração usando oócitos vitrificados e um sistema submarino.

Outras características que são avaliadas no espermatozoide, incluem funcionalidade da membrana (viabilidade), estrutura e integridade do DNA, presença e/ou identificação de moléculas na estrutura do espermatozoide e no plasma seminal.

A viabilidade ou funcionalidade da membrana do espermatozoide é requerida no processo da capacitação, na capacidade de se ligar ao oócito, na reação acrossômica e ao se ligar na superfície do oócito. Essa também é objeto de estudo quando da armazenagem do sêmen. A estrutura e

funcionalidade do DNA do espermatozóide têm grande importância no período que sucede a penetração. Em humanos danos no DNA nas células masculinas são associados com qualidade de sêmen, baixas taxas de fertilização, debilitado desenvolvimento no período de pré-implantação e aumento nos índices de aborto (Lewis & Aitken, 2005). A integridade da cromatina pode ser mensurada por citometria de fluxo o denominado teste de estrutura da cromatina (Everson *et al.*, 1994), denominado de “cometa e túnel” (Lewis & Aitken, 2005). Em suínos, a integridade da cromatina é diretamente relacionada com a fertilidade (Everson *et al.*, 1994; Everson, 1999), sendo que a integridade e a condensação da cromatina são afetadas pelo processo de congelamento (Hamamah *et al.*, 1990; Cordova *et al.*, 2002).

Nos sistemas de avaliação que incluem fertilização *in vitro* e subsequente desenvolvimento, observa-se que embriões produzidos *in vitro* têm alta incidência de poliploidia e mixoploidia a qual é relacionada à alta frequência de fertilização polispermica. Por outro lado de acordo com Hunter & Nichol (1998) a polispermia é um indicador do número de espermatozoides capacitados presentes junto aos oócitos ovulados no oviduto da fêmea inseminada. Por este fenômeno contribuir negativamente aos processos de clivagem e desenvolvimento embrionário pode justificar o porquê amostras de boas características espermáticas possam apresentar baixo desenvolvimento embrionário.

As condições do co-cultivo dos gametas são suficientes para induzir a capacitação espermática e a reação acrossômica, sendo que período de co-incubação a partir de 2 a 6 horas faz com que o número de espermatozoides por oócitos aumente gradativamente (Alminãna *et al.*, 2005). Dessa forma períodos de co-cultivo longos podem contribuir negativamente para os resultados de desenvolvimento embrionário.

Quanto as anormalidades cromossômicas, estas podem resultar em falha reprodutiva, que é manifestada em atraso e/ou baixa clivagem, parada do desenvolvimento ou morte embrionária precoce (Ulloa Ulloa *et al.*, 2008). Porém, ainda não foi possível demonstrar uma direta relação da integridade da cromatina com a fertilidade *in vitro* (Cordova *et al.*, 2002).

Algumas moléculas atuam negativamente no processo de fertilização, como as proteínas presentes no plasma seminal e na cabeça do

espermatozóide (Braundmeier & Miller, 2001). A identificação da presença dessas proteínas no ejaculado pode permitir a seleção prévia de ejaculados com maiores chances de suportar ao processo de criopreservação, ou ainda tornar possível essa mesma identificação no intuito de que o plasma seminal seja o quanto antes retirado da porção total do ejaculado, anteriormente à criopreservação.

Entre tantos testes espermáticos, os testes de fertilização *in vitro* são considerados por vários autores como os mais adequados, por verificarem todas as etapas da função espermática durante a fertilização (Gadea, 2005), bem como uma variedade de fatores associados com o processo de fertilização (Coy & Romar, 2002) e eliminarem os efeitos causados pela fertilidade da fêmea.

A ligação e penetração da zona pelúcida é uma das mais importantes barreiras que o espermatozóide enfrenta durante o processo da fertilização (Harrison, 1997). Portanto, testes que incluem o estudo da interação dos gametas parecem ser a melhor forma de prever a fertilidade dos espermatozóides (Larsson & Rodriguez-Martinez, 2000).

Quando os testes de fertilização *in vitro* são utilizados, a taxa de penetração é comumente usada para mensurar a habilidade de fertilizar, porém, mesmo que a média de espermatozóides que penetraram por oócito não reflita os eventos que ocorrem durante a fertilização *in vivo*, essa medida é uma estimativa do número de espermatozóides com alta capacidade fertilizante (Gadea, 2005). Os testes que usam oócitos imaturos para verificar a capacidade fertilizante dos espermatozóides, através do teste de penetração, somente refletem o primeiro momento da fertilização. A fertilização é seguida por outras etapas que só podem ser avaliadas com oócitos maduros, testes como verificação da formação do pronúcleo masculino (formação pronuclear) e desenvolvimento embrionário (Larsson & Rogriguez-Martinez, 2000).

Hammitt *et al* (1998) cita a baixa relação tem sido encontrada entre os parâmetros espermáticos e a habilidade de penetração espermática *in vitro*, porém esses resultados podem ser atribuídos às diferenças experimentais para PIV, pequeno número de ejaculados usados nos testes, alto número de espermatozóides por oócito nos testes, e a pré-seleção de ejaculados (Ivanova & Mollova, 1993; Martinez *et al.*, 1993).

Almiñana *et al* (2005) descrevem que a maioria dos protocolos de fertilização *in vitro* em suínos utilizam substâncias que aumentam a motilidade, estimulo a capacitação e reação acrossômica, isso pode justificar as altas taxas de polispermia na produção *in vitro* de embriões suínos, porém o uso destas substâncias no teste penetração oocitária *in vitro* deve ser evitado já que o objetivo do teste é avaliar a capacidade que o espermatozóide tem de penetrar no oócito, e a polispermia é relacionada positivamente com a fertilidade *in vivo* (Gadea *et al* 1998). Dessa forma torna-se difícil comparar os resultados mostrados até agora.

O uso de um protocolo padrão de PIV, com o número relativamente baixo e fixo de espermatozóides por oócito, sem nenhum ajuste para motilidade após a capacitação do sêmen *in vitro*, pode diminuir os fatores de confundimento na avaliação de sêmen *in vitro*, ajudando a identificar variações de fertilidade.

Entretanto, o conhecimento do efeito do congelamento sobre as células espermáticas evoluiu nos últimos anos. Novos testes, avaliando a funcionalidade da célula espermática em sistemas de fertilização *in vitro*, têm sido usados para a avaliação da potencial capacidade fertilizante. O uso destes mesmos testes, com o objetivo de identificar os melhores protocolos de congelamento de sêmen, ainda é inexpressivo, devido às dificuldades de estabelecer padrões, uma vez que não há um protocolo padronizado para fertilização *in vitro* e/ou testes que envolvam parte do processo de fertilização, como é o caso do teste de penetração espermática *in vitro* em suínos.

Capítulo II: AVALIAÇÃO DA DIMETILACETAMIDA E DO GLICEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO ATRAVÉS DE TESTES DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

1. Introdução

Em função dos impactos econômicos, genéticos e sanitários, umas das principais tecnologias utilizadas no sistema de produção de suínos, é a inseminação artificial (IA), realizada com sêmen diluído e acondicionado refrigerado, entre 15 e 18°C (Corrêa *et al.*, 2001). Além da IA convencional com sêmen refrigerado, existem novas tecnologias com potencial de aplicação, como é o caso da IA com sêmen preservado a 5 °C (Corrêa *et al.*, 2004; 2006), da inseminação com baixo número de espermatozóides (Vazquez *et al.*, 2008), do congelamento (criopreservação) de espermatozóides e embriões, da sexagem espermática e da transferência não cirúrgica de embriões (Martinez *et al.*, 2005).

Com relação ao sêmen suíno criopreservado, até o presente momento a sua utilização é extremamente restrita, principalmente devido ao baixo desempenho, e também devido aos demorados processos de congelamento, à existência de uma grande variação na congelabilidade espermática entre machos e entre ejaculados do mesmo macho, à elevada concentração de espermatozóides por dose inseminante, quando comparada com os resultados obtidos com sêmen refrigerado (Johnson, 1985; Roca *et al.*, 2003; Saravia *et al.*, 2005). A grande variação obtida na congelabilidade e na fertilidade com o sêmen congelado também pode ser atribuída à ineficiência dos crioprotetores e diluentes utilizados nos processos de criopreservação, resultando em alterações na membrana plasmática, indução da capacitação e da reação

acrossômica (Guthrie & Welch, 2005). A variação entre cachaaos, na qualidade do sêmen pós-congelamento, também é atribuída a fatores genéticos (Thurston, *et al.*, 2002).

Sendo o glicerol o crioprotetor intracelular mais utilizado para congelar o sêmen de suínos (Westendorf *et al.*, 1975; Johnson, 1985; Bordignon *et al.*, 1996; Roca *et al.*, 2003; Maldjian *et al.*, 2005), o que indica que a maioria das pesquisas realizadas estão baseadas no mesmo crioprotetor, com pequenas variações nos processos de congelamento. Modificações nos processos de criopreservação, através da redução do tempo de processamento, da temperatura e do tempo de descongelamento, e da utilização de amidas como crioprotetor intracelular, foram realizadas por Bianchi *et al.* (2008a).

Métodos clássicos de avaliação da qualidade do sêmen de suínos, tais como concentração espermática, motilidade progressiva, percentagem de células viáveis e morfologia do acrossoma, apresentam baixa associação com a fertilidade, pois somente amostras de sêmen com qualidade inferior são detectadas (Gadea, 2005). Desta forma, novos métodos, como a fertilização *in vitro* tem sido utilizados para avaliar os efeitos dos processos de criopreservação sobre determinadas funções espermáticas (Sellés, *et al.*, 2003; Peláez *et al.*, 2006), e também para estimar a fertilidade *in vivo* (Bordignon *et al.*, 1996; Sellés *et al.*, 2003; Bianchi *et al.* 2008b). Além disso, o teste de penetração *in vitro* em oócitos homólogos vitrificados (Macedo *et al.*, 2006), pode ser utilizado como um método de avaliação da capacidade de fertilização dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação.

Devido às dificuldades e custos para realização de testes de fertilidade *in vivo*, visando avaliar novos diluentes, crioprotetores e processos de criopreservação de sêmen suíno (Bordignon *et al.*, 1996; Bianchi *et al.* (2008b), é fundamental aprimorar e simplificar as avaliações através de métodos *in vitro*, os quais possam ser utilizados para estimar o potencial da fertilidade *in vivo* do sêmen congelado.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência dos crioprotetores intracelulares, glicerol e dimetilacetamida, no processo de congelamento de sêmen suíno, através da observação da motilidade, morfologia espermática, integridade de membrana, teste de penetração *in vitro* em oócitos homólogos vitrificados e produção *in vitro* de embriões.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta do sêmen

Foram utilizados quatro machos suínos cruzados (Landrace x Large White) com aproximadamente 24 meses de idade e fertilidade conhecida e em regime de coleta. Os machos F1 (M1, M3, M4 e M9) eram manejados sob as mesmas condições ambientais e alimentação. De cada macho foram obtidos sete (7) ejaculados, durante um período de três semanas. As coletas de sêmen foram realizadas através do método da mão-enluvada (Corrêa *et al.*, 2001), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rica em gel. Alíquotas da fração rica do ejaculado, foram utilizadas para o processo de congelamento. Somente ejaculados com motilidade espermática superior a 70% foram utilizados para os congelamentos.

2.2. Processo de criopreservação do sêmen

O sêmen foi processado para a criopreservação conforme descrito por Bianchi *et al.* (2008a). Imediatamente após a coleta do sêmen de cada macho, foram obtidas duas alíquotas de 20 ml da fração rica em espermatozóides, colocadas em tubos cônicos de 50 ml e diluídas (1:1, v/v) no diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (Pursel & Johnson, 1975). Para essa diluição o BTS teve a temperatura ajustada com a temperatura do sêmen. Cada uma das duas alíquotas foi destinada ao congelada com um dos tratamentos.

Após a diluição inicial foi feito o processo de refrigeração das duas alíquotas. O processo de refrigeração foi dividido em três etapas. A primeira etapa realizada em 90 min com redução da amostra já diluída até 24 °C. Essa refrigeração ocorreu à temperatura ambiente. Na segunda etapa, realizada em 90 min o sêmen foi refrigerado até 15 °C, quando então foi feita a

centrifugação, em centrífuga refrigerada (15 °C) a 800 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozoides foi re-suspenso no diluidor de refrigeração composto de 80%, v/v (80% de solução de refrigeração e 20% de *pellet* de sêmen). A solução de refrigeração foi composta de solução de lactose a 11% e 20%, v/v gema de ovo. Na diluição de resfriamento a concentração espermática foi ajustada para $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml.

Na terceira etapa, após acrescentar o diluidor de refrigeração, o sêmen foi submetido ao resfriamento por 90 min até a temperatura de 5 °C. A curva de refrigeração foi realizada em um sistema de refrigeração para sêmen.

Cada alíquota (duas alíquotas) de cada um dos ejaculados (sete ejaculados) foi submetido ao processo de criopreservação utilizando dois crioprotetores intracelulares: Glicerol ou Dimetilacetamida (DMA). Os crioprotetores intracelulares tem os seguintes pesos moleculares: Glicerol 92,09 e Dimetilacetamida (DMA) 87,12 respectivamente. Para cada alíquota de sêmen congelado foram armazenadas dez palhetas de 0,5 ml.

Para o processo de congelamento, os diluidores foram elaborados a partir do diluidor de refrigeração, acrescido dos respectivos crioprotetores para concentração final de 3%, v/v, para o Glicerol e de 5%, v/v, para a DMA. O diluidor de congelamento foi adicionado aos tubos contendo o sêmen já refrigerado, onde ambos, sêmen e diluidor de congelamento, estavam refrigerados a temperatura de 5 °C. Imediatamente após a diluição, foi feito o envase do sêmen em palhetas plásticas de 0,5 ml, com concentração final de 500×10^6 espermatozoides/palheta. O processo foi realizado em câmara refrigerada com temperatura entre 5 a 10 °C.

As palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio, horizontalmente a 5 cm acima da superfície do nitrogênio líquido, por um tempo mínimo de 20 min, passados os 20 min as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C até o descongelamento.

A mesma metodologia foi utilizada para o congelamento de um *pool* de sêmen dos quatro machos, com o diluente de congelamento DMA, o qual foi utilizado como controle positivo para a produção *in vitro* (PIV) dos embriões. Quanto ao controle positivo o mesmo serviu de forma que somente quando a produção *in vitro* de embriões com o controle positivo evoluiu, o resultado dos tratamentos avaliados nesse período foi utilizado.

2.3. Processo de descongelamento do sêmen

O sêmen foi processado para a o descongelamento conforme descrito por Peña *et al.* (2003). O descongelamento das palhetas foi feito em banho-maria a 37 °C por 20 s, o conteúdo de cada palheta foi re-suspenso em tubo cônico contendo 10 ml de BTS previamente aquecido a 37 °C (1:20, v/v).

Para a realização dos testes de fertilização *in vitro* (teste de penetração e produção de embriões) o sêmen utilizado foi proveniente da mesma palheta. O descongelamento foi feito da mesma forma descrita anteriormente, porém, apenas 200 µl da amostra contida na palheta foi re-suspensa em igual volume de solução de pré-incubação, onde permaneceu por 15 min a 38 °C até ser feita a inseminação *in vitro*. A solução de pré-incubação foi composta de TCM 199 (com sais de Earle) suplementado com 0,91mM de piruvato, 5,5mM glucose, 50 µg/ml sulfato de estreptomicina, 1,1 µg/ml lactato de Ca, pH = 7,8 (Macedo *et al.*, 2006).

2.4. Avaliação da qualidade espermática

As amostras de sêmen fresco e congelado/descongelado foram submetidas à avaliação de motilidade, morfologia normal e integridade de membrana.

2.4.1. Motilidade e morfologia

Essas avaliações foram realizadas após a coleta do ejaculado e pós-descongelamento.

Para avaliação após a coleta o sêmen foi diluído em BTS e incubado em banho-maria a 37 °C por 10 min, antes da avaliação. Nenhum tipo de reagente foi adicionado à amostra já diluída para essa avaliação. Os espermatozoides foram observados através de microscopia convencional, com a amostra sob lâmina e lamínula, e a motilidade foi avaliada (0 a 100%). A morfologia foi analisada através da contagem de 200 células com auxílio de microscopia óptica com contraste de fase (Corrêa *et al.*, 2001).

2.4.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foram utilizadas as sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), segundo técnica descrita por Harrison & Vickers (1990). A

avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, através de excitação em filtro WU) sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozóides em uma mesma lâmina e classificados conforme sua coloração em íntegros (espermatozóides corados em verde, em toda sua extensão) e lesados (espermatozóides corados em vermelho).

2.5. Teste de penetração *in vitro* (TPIV)

Para a realização do TPIV foi utilizada a metodologia descrita por Macedo *et al.* (2006). Anteriormente à realização do TPIV, ovários de fêmeas suínas pré-púberes (aproximadamente 95 Kg) recém abatidas, foram coletados em um abatedouro local e levados ao laboratório, mantidos em PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) a 37 °C, sendo que o período entre a coleta dos ovários e punção dos folículos foi de 4 a 5 h.

No laboratório os ovários foram submetidos a cinco banhos em solução de PBS, na mesma temperatura de chegada e, em seguida, submetidos à punção dos folículos de 3 a 6 mm de diâmetro, utilizando agulha de calibre 60x12 acoplada a seringa descartável de 10 ml. O líquido folicular recuperado era em seguida colocado em tubo cônico de 15 ml, onde permanecia por 10 min até os oócitos se depositarem no fundo do tubo. Todo o processo de punção seguida da espera de 10 min nos tubos era feito em banho-maria a 25 °C. Logo após, o sedimento da porção inferior do tubo era recuperado e avaliado sob lupa estereomicroscópica, para procura, seleção e recuperação dos oócitos. Somente oócitos com ooplasma homogêneo e várias camadas compactas de células do *cumulus oophorus* foram selecionados. Posteriormente à seleção, os oócitos foram desnudos por sucessivas passagens através da ponteira de uma micropipeta dosadora graduada de 200µL, em líquido folicular para a retirada das células do *cumulus oophorus*. Os oócitos sem as células do *cumulus oophorus* (desnudos) foram então lavados várias vezes em meio composto por TCM199 até a total retirada de células, e então submetidos ao congelamento em criotubos.

Para o congelamento os oócitos, em grupos de 30 a 40, foram passados em três gotas da solução de congelamento composta de 0,7 M de dimetilsufóxido (DMSO), 0,9 M de etilenoglicol e 0,1% do bloqueador sintético de gelo Supercool™ X-1000 (copolímero), permanecendo nessa solução por 2

min. A temperatura da solução de congelamento a que os oócitos foram submetidos era de 37° C. Em seguida os oócitos foram transferidos para o interior dos criotubos, os quais nesse momento já estavam expostos ao vapor de nitrogênio líquido (N₂L). Em seguida foi colocado em cada criotubo (o criotubo já com os oócitos) 1 ml da solução de fecundação e, após o completo congelamento, adicionado ainda 1,2 ml de óleo de silicone, quando o criotubo era fechado e submerso por completo no N₂L. A solução de fecundação bem como o óleo de silicone estavam em temperatura ambiente (em torno de 12° C). A solução de fertilização foi composta de TCM 199 (com sais de Earle) suplementado com 0,91 mM de piruvato, 5,5 mM glucose, 50 µg/ml sulfato de estreptomicina, 1,1 µg/ml lactato de cálcio, com pH 7,4 (Macedo *et al.*, 2006). Os oócitos permaneceram em nitrogênio líquido por um período mínimo de 3 meses e por período máximo de 6 meses.

O descongelamento foi realizado expondo o criotubo contendo os oócitos, meio de fecundação e óleo de silicone, em banho-maria a 60 °C por 150 s. Em seguida o conteúdo de cada criotubo foi transferido através de pipeta Pasteur, para frasco de vidro (de 20ml tipo penicilina, com tampa de borracha) (Macedo *et al.*, 2006). Os frascos não eram aquecidos previamente a receber o conteúdo do criotubo. No descongelamento do conteúdo do criotubo se misturava completamente, devido a esse fato logo que o conteúdo do criotubo era transferido ao frascos, o frasco então recebia a mistura gasosa e era colocado em banho-maria e dessa forma aguardava por tempo mínimo de 30 min até a inseminação com o sêmen descongelado.

Para o teste de penetração espermática as palhetas de sêmen de cada macho, coleta e tratamento, foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 20 s (Bianchi *et al.*, 2008a) e uma alíquota de 200 µl do conteúdo da palheta foi adicionado a igual volume de solução de pré-incubação, composto de TCM 199 (com sais de Earle e Hapes), suplementado com 0,91 mM de piruvato, 5,5 mM glucose, 50 µg/ml sulfato de estreptomicina, 1,1 µg/ml lactato de cálcio, com pH 7,8, onde foi incubado por 15 min em banho-maria a 39 °C (Macedo *et al.*, 2006).

Na gota de fecundação, contendo os oócitos, foi adicionada a dose inseminante na concentração de 2000 espermatozóides por oócito (Peláez *et al.*, 2006), assim os oócitos e espermatozóides permanecendo os gametas co-

incubados durante 3 horas. Quanto a co-incubação para a realização do TPIV os frascos permaneceram parcialmente imersos em banho-maria (a 39°C) anteriormente à inseminação e no período de co-incubação. Para a gaseificação os frascos receberam uma mistura gasosa composta de 5% de dióxido de carbono, 5% de oxigênio e 90% de nitrogênio, 2 h antes da inseminação e também imediatamente após a inseminação.

Após o período de co-incubação os oócitos foram recuperados, lavados, submetidos ao corante Hoescht 33342 (10 µg/ml) e avaliados em microscópio de fluorescência sob 400x de aumento. Oócitos que tiveram espermatozóides em seu interior foram considerados fertilizados e o número de espermatozóides no interior de cada oócito foi contado.

2.5.2. Produção *in vitro* de embriões

Os oócitos foram obtidos através da punção folicular de ovários de leitoas recém abatidas da mesma forma como descrito para o TPIV. Apenas oócitos com *cumulus* compacto foram selecionados. Depois de selecionados, grupos de 40 a 50 oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 44 h, em gotas de 500 µl de meio de maturação, coberto por óleo de silicone, em placas de Petri.

O meio de maturação foi composto de TCM 199 (com sais de Earle e Hepes) suplementado com 10% de fluido folicular suíno (FFs), 0,91 mM de piruvato de sódio, 10 UI/ml de gonadotrofina coriônica da égua prenhe (eCG), 10 UI/ml de gonadotrofina coriônica humana (hCG), 150 µM de cisteamina, 75 µg/ml de penicilina G sódica, 50 µg de sulfato de estreptomicina (Yi & Park, 2004; Somfai *et al.*, 2005). O FFs foi obtido por aspiração dos folículos ovarianos, esse líquido foi então submetido a centrifugação a 1800 x g por 90 min, o sobrenadante recuperado e armazenado a -20 °C até colher-se 11 amostras, quando as amostras foram descongeladas, misturadas e centrifugadas novamente, em seguida estocadas a -20 °C em *ependorf* até seu uso (Somfai *et al.*, 2005).

Entre 20 e 22 h após a maturação, os oócitos foram recuperados e cultivados por mais 22 h sem cisteamina e hormônios. A maturação foi realizada em estufa convencional em ambiente com 5% de CO₂ em ar a 39 °C. Ao final do período de maturação alguns oócitos foram recuperados para

avaliação da maturação, corados com Hoescht e avaliados em microscópio de fluorescência, observando-se a vesícula germinativa (imaturado) ou o primeiro corpúsculo polar (maturo).

Após o período de MIV os oócitos foram transferidos, em grupos de 20 oócitos, para o meio de fertilização, sendo a gota de fertilização de 200 μL e coberta de óleo de silicone. O meio de fertilização é igual ao utilizado no TPIV.

Para a fertilização *in vitro* o sêmen foi descongelado e preparado da mesma forma que para o TPIV. Após o período de pré-incubação do sêmen, a dose inseminante na concentração de 1×10^5 espermatozoides por ml (2000:1, espermatozoides:oócito) foi adicionada à gota de fertilização contendo os oócitos (Peláez *et al.*, 2006), permanecendo co-incubados oócitos e espermatozoides por 3 h. A composição do meio de fertilização foi a mesma do TPIV. Após o período de fertilização os oócitos foram recuperados e lavados em meio de cultivo, com auxílio de micropipeta graduada de 200 μL da mesma forma que os oócitos do TPIV. Após a lavagem dos oócitos os mesmos foram transferidos para o cultivo em meio PZM-3 (Yoshioka *et al.*, 2002) suplementado com 50 μM de β -mercaptoethanol (Abeydeera *et al.*, 1998) coberto por óleo de silicone, em gotas de 500 μL coberta por óleo de silicone. Durante o cultivo o meio PZM-3 foi trocado parcialmente (250 μL foram retirados e 250 μL de PZM-3 suplementado com 10% de soro fetal bovino foram adicionados) no dia 2, o mesmo procedimento repetido no dia 4 (Okada *et al.*, 2006).

O dia da FIV foi definido como dia zero. Os embriões foram avaliados durante o cultivo, sob lupa estereomicroscópica no dia 2, para observação do número de embriões de duas células (taxa de clivagem) e nos dias 6 e 7 para a observação do número de mórulas e blastocistos (taxa de desenvolvimento embrionário).

2.6. Análise estatística

Para todas as respostas, foram geradas distribuições de freqüências, em função dos tratamentos e dos machos utilizados. O percentual de oócitos com espermatozoides em seu interior no TPIV foi comparado entre os machos através do teste de qui-quadrado. Regressão logística foi utilizada para a avaliação do efeito da interação entre machos e tratamentos sobre as

respostas de interesse, que foram sempre consideradas como binomiais (1 ou 0). Nestas análises, diferentes combinações entre tratamentos e machos foram consideradas como níveis de referências para as comparações.

A avaliação de motilidade, morfologia e viabilidade espermática, taxa de clivagem, desenvolvimento embrionário e número de espermatozóides que penetraram por oócito foi realizada por a análise de variância com medidas repetidas, em função das seguintes variáveis independentes: tratamento, coleta, macho, interação tratamento X macho e interação tratamento X macho X coleta. As variáveis que não seguiam distribuição normal foram transformadas para a escala logarítmica. Porém, para fins de interpretação, os resultados das análises envolvendo as variáveis transformadas foram relatados em sua escala original. A comparação de médias foi feita através do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas através do programa Statistix[®] (2003).

3. Resultados

Os resultados da avaliação da qualidade espermática, teste de penetração *in vitro* e de produção *in vitro* de embriões, de acordo com o crioprotetor utilizado no congelamento do sêmen, são apresentados na Tabela 1. A motilidade e a integridade de membrana foram superiores no sêmen congelado com o crioprotetor DMA em relação ao Glicerol ($P < 0,05$). A produção de embriões *in vitro* obtida não foi diferente ($P > 0,05$) entre os dois crioprotetores. Entretanto, o número de espermatozoides no interior dos oócitos (considerados fertilizados) no sêmen congelado com DMA foi maior ($P < 0,05$) do que com o Glicerol.

A avaliação dos parâmetros de qualidade espermática para cada macho está apresentada na Tabela 2.

Tabela 1: Efeitos dos dois crioprotetores sobre a qualidade espermática, no teste de penetração espermática *in vitro* (TPIV) e na produção *in viro* de embriões (PIV) obtidas com o sêmen congelado/descongelado de quatro machos suínos.

Tratamento	MOT %	MORF %	IM %	TPIV			PIV
				Fertilização oócitos, % (n)	Fertilização monospérmica, (%)	Espermatozóides por oócito	Mórulas e blastocistos, (% sobre os total de oócitos inseminados)
Glicerol	21,9 ^b	82,3	13,0 ^b	13,6 (76) ^b	72,4	20,7 ^b	22,0 ^a
DMA	38,1 ^a	80,4	39,9 ^a	27,9 (145) ^a	56,6	29,2 ^a	15,8 ^a

^{a, b} Diferentes letras na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

MOT: Motilidade; MORF: Morfologia; IM: Integridade de membrana; TPIV: Teste de penetração *in vitro*; PIV: Produção *in vitro* de embriões. Avaliadas 24 palhetas por macho.

Tabela 2: Efeitos dos dois crioprotetores sobre a qualidade espermática, no teste de penetração espermática *in vitro* (TPIV) e na produção *in viro* de embriões (PIV) obtidas com o sêmen congelado/descongelado de cada um dos machos suínos.

Macho	MOT %	MORF %	IM %	TPIV			PIV
				Fertilização oócitos, % (n)	Fertilização monospérmica, % (n)	Espermatozóides por oócito	Mórulas e blastocistos, (%)
M1	22,1	62,4	28,7	22,7 (55) ^b	67,3 (37)	22,1 ^b	21,4
M3	25,7	86,2	22,1	16,5 (44) ^{bc}	72,7 (32)	28,0 ^a	18,3
M4	37,5	89,5	26,3	11,7 (37) ^c	81,1 (30)	29,4 ^a	17,6
M9	35,7	88,4	28,6	33,7 (85) ^a	44,7 (38)	20,4 ^b	18,1

^{a, b, c} Diferentes letras na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

MOT: Motilidade; MORF: Morfologia; IM: Integridade de membrana; TPIV: Teste de penetração *in vitro*; PIV: Produção *in vitro* de embriões. Foram avaliadas 12 palhetas por macho.

Tabela 3: Tabela 2: Efeitos dos dois crioprotetores sobre a qualidade espermática, no teste de penetração espermática *in vitro* (TPIV) e na produção *in viro* de embriões (PIV) obtidas com o sêmen congelado/descongelado de cada um dos machos suínos em cada um dos tratamentos avaliados.

Tratamento	Macho	TPIV		
		Fertilização oócitos - Oócitos com espermatozóides aderidos % (n)	Fertilização monospérmica - Oócitos com apenas 1 espermatozóide aderido % (n)	Espermatozóides por oócito
Glicerol	M1	19,0 (23) ^{bc}	82,6 (10)	20,8 ^{de}
DMA	M1	26,4 (32) ^b	56,3 (18)	23,4 ^{cd}
Glicerol	M3	16,8 (29) ^c	62,1 (18)	24,6 ^{cde}
DMA	M3	16,0 (15) ^{bc}	93,3 (14)	31,4 ^b
Glicerol	M4	2,5 (04) ^d	100,0 (04)	20,3 ^{de}
DMA	M4	20,8 (33) ^{bc}	78,8 (26)	38,6 ^a
Glicerol	M9	18,7 (20) ^{bc}	70,0 (14)	17,3 ^e
DMA	M9	44,8 (65) ^a	36,9 (24)	23,5 ^{bc}

a, b, c, d, e Diferentes letras na mesma coluna diferem estatisticamente.

TPIV: Teste de penetração *in vitro*

Avaliadas 6 palhetas por macho.

Avaliando os oócitos submetidos ao TPIV (Tabela 4), separados de acordo com o tratamento de congelamento utilizado, o grupo Glicerol apresentou 13,6% dos oócitos com espermatozóides em seu interior (considerados fertilizados) e 86,4% dos oócitos sem espermatozóides em seu interior (considerados não fertilizados). O tratamento DMA apresentou 27,9% dos oócitos fertilizados e 72,1% considerados não fertilizados.

Tabela 4: Distribuição de freqüência de fertilização no TPIV em cada tratamento.

Resultado do TPIV	Glicerol, % (n)	DMA, % (n)	Total
Fertilizados - Oócitos com espermatozóides aderidos	13,6% (76) ^b	27,9% (145) ^a	221
Não fertilizados – oócitos sem espermatozóides aderidos	86,4% (483)	72,1% (374)	857
Total	100% (559)	100% (519)	1078

^{a, b} Diferentes letras na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05)

TPIV: Teste de penetração *in vitro*; DMA: Dimetilacetamida

O Glicerol apresentou 72,4% dos oócitos com fertilização monospérmica e 27,6% fertilização polispérmica. No tratamento DMA, 56,6% dos oócitos fertilizados foram monospérmicas e 43,4% fertilização polispérmica (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição de freqüência de fertilização monospérmica e polispérmica por tratamento no teste de penetração espermática *in vitro*.

Fertilização	Glicerol		DMA	
	N	Oócitos, %	N	Oócitos, %
Monospérmica – um espermatozóide aderido	55	72,4%	82	56,6%
Polispérmica – mais de um espermatozóide aderido	21	27,6%	63	43,4%

DMA: Dimetilacetamida

4. Discussão

O uso do crioprotetor DMA proporcionou melhores resultados de motilidade espermática, integridade de membrana, taxa de fertilização e número médio de espermatozóides por oócito no TPIV em relação ao Glicerol.

No presente trabalho, a TPIV aproxima-se das taxas obtidas por Macedo *et al.* (2006), utilizando oócitos vitrificados e sêmen armazenado até 72 h sob refrigeração. Entretanto, os resultados do presente trabalho com sêmen congelado, são inferiores aos obtidos por Xu *et al.* (1998) os quais utilizaram oócitos homólogos maturados *in vitro* não criopreservados e sêmen fresco.

A taxa de fertilização dos oócitos utilizando o crioprotetor DMA (27,9%), foi próxima aos 30,4% de oócitos penetrados obtidos por Gil *et al.* (2004). Deve-se ressaltar que estes autores, realizaram todas as etapas do processo utilizando estufa convencional, com centrifugação do sêmen após o descongelamento, 12 h de co-incubação oócito:espermatozóides e cafeína no meio de fertilização.

O crioprotetor DMA além de apresentar melhor resultado taxa de fertilização no TPIV, também proporcionou um número superior de espermatozóides com motilidade, integridade de membrana e espermatozóides por oócito, sendo esta última variável um indicador da capacidade da célula espermática de ultrapassar efetivamente as barreiras do oócito no processo de fertilização. Bianchi *et al.* (2008a), também constataram que o crioprotetor DMA é superior em preservar a motilidade e a integridade de membrana dos espermatozóides em relação ao Glicerol.

O percentual de formação de mórula/blastocisto no presente trabalho, é semelhante ao que foi descrito por Gil *et al.*, (2003) que utilizaram sêmen congelado-descongelado e obtiveram entre 18,9 e 32,5% de formação de blastocisto. No trabalho os autores acima citados procederam ao

descongelamento do sêmen e posterior centrifugação, por 3 vezes a 1900 x g por 3 min em PBS suplementado com 0,1% de BSA e antibióticos. Além disso realizaram a co-incubação dos gametas por 6 h. Esse protocolo diferiu do protocolo desenvolvido no presente trabalho onde o período de co-incubação dos gametas foi de apenas 3 h e não foi utilizada a centrifugação no processamento do sêmen.

Deve-se ressaltar que estudos visando estabelecer relação entre fertilidade e fatores espermáticos são difíceis, devido à complexidade dos processos. A relação entre as avaliações às quais o sêmen pode ser submetido, e os efeitos do processo de criopreservação sobre as células espermáticas, têm evoluído últimos anos, principalmente devido à utilização de testes de avaliação da funcionalidade das células espermáticas nos sistemas de fertilização *in vitro*.

Os resultados observados no teste de penetração espermática *in vitro* (TPIV), mostraram que é viável a utilização deste teste, reduzindo o período de co-incubação dos gametas a apenas 3 h, utilizando um sistema de incubação alternativo e oócitos imaturos congelados-descongelados, bem como não utilizando substâncias que potencializam a fertilidade do sêmen. Demonstrou-se também, que não há necessidade de centrifugação das amostras de sêmen quando da utilização do TPIV.

O desenvolvimento e o estabelecimento de metodologias simplificadas como os testes *in vitro* utilizados no presente trabalho, podem ser utilizadas para avaliações da funcionalidade espermática de machos suínos e, também, para a avaliação de metodologias de criopreservação.

Nos testes em que não foi observada uma melhoria dos resultados, com o uso do crioprotetor DMA, também não foi verificada diferença estatística quando os resultados foram comparados aos observados com o uso do crioprotetor Glicerol. Diante disso, é possível concluir que, nos testes de fertilidade utilizados, exceto para os resultados de desenvolvimento embrionário, observou-se que o uso do crioprotetor DMA foi igual, ou melhor, que o uso do crioprotetor Glicerol.

A variabilidade observada até o presente momento nos resultados publicados por vários autores pode ter origem em diferenças experimentais, onde diferentes protocolos usam ou não centrifugação para seleção de células

espermáticas, diferentes períodos de co-incubação dos gametas, oócitos maduros e imaturos para o mesmo teste sem o conhecimento da real maturação destas células, e ainda o uso de substâncias nos meios de pré-incubação e fertilização que tenham poder de potencializar o poder de penetração e fertilização do espermatozóide. Estas substâncias, como heparina, cafeína e cálcio parecem ter seu efeito influenciado pelo macho.

No presente trabalho foi possível produzir embriões *in vitro* de suínos com os dois tratamentos avaliados, trabalhando com concentração espermática fixa e tempo de co-incubação dos gametas de 3 h, sendo que não foi utilizada nos meios de incubação nenhuma substância com objetivo de melhorar a performance dos machos avaliados.

Uma dificuldade experimental enfrentada durante a realização das etapas da PIV, estava relacionada com a estufa de CO₂ utilizada, a qual apresentou variação no nível dos gases. Esta variação pode ter influenciado negativamente os processos de maturação *in vitro* dos oócitos e desenvolvimento embrionário *in vitro*, podendo desta forma ter prejudicado os resultados do desenvolvimento embrionário. Essa variação não invalida os resultados, uma vez que foi observada durante todo o período experimental e sobre todos os machos e tratamentos testados.

Sugere-se que para o uso futuro dos protocolos desenvolvidos no presente trabalho, seja avaliado o *status* nuclear dos gametas femininos após a clivagem, na tentativa de explicar os resultados apresentados pelo tratamento DMA no desenvolvimento embrionário, o qual apresentou fertilização polispérmica alta e desenvolvimento embrionário baixo. Especula-se que a maior viabilidade espermática observada com o crioprotetor DMA induziu a penetração de um maior número médio de espermatozoides por oócito, causando fertilização polispérmica e, possivelmente, poliploidia o que justifica o baixo desenvolvimento embrionário observado..

O mesmo padrão de resultados obtidos no presente trabalho foi observado por Yi & Park (2004), determinando o efeito da concentração espermática, e do meio de cultivo, sobre a fertilização e o desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro*. Os referidos autores observaram que a concentração espermática que resultou nos melhores índices de fertilização polispérmica e no maior número médio de espermatozoides por oócito,

apresentou o segundo menor índice de desenvolvimento embrionário. Por outro lado, Roca *et al.* (2005) avaliando os efeitos da adição de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) na criopreservação de sêmen suíno, demonstraram que a adição de SOD ao crioprotetor aumentou o percentual de células espermáticas viáveis com acrossomas intactos após o descongelamento, porém, eles descrevem que não houve efeito significativo sobre a taxa de clivagem e a formação de blastocisto. No presente trabalho a adição de SOD melhorou a viabilidade espermática, porém, diminuiu a formação de blastocistos. No entanto quando a viabilidade espermática aumentou a taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário diminuiu. Especulando-se sobre os resultados, parece haver mais do que apenas coincidência entre o experimento do autor Roca *et al.*(2005) e os resultados apresentados especificamente pelo tratamento DMA, neste trabalho.

Quanto ao uso da fertilização *in vitro*, segundo Gadea (2005) seu uso permite avaliar uma grande variabilidade de fatores associados com o processo de fertilização e eliminar alguns dos fatores que afetam a fertilidade *in vivo*. Entretanto, a fertilização *in vitro* não permite ou exige a expressão de todos os atributos funcionais dos espermatozóides depositados no trato reprodutivo da fêmea, especialmente sobre integridade do DNA espermático no desenvolvimento embrionário e na manutenção da gestação. Desta forma, em trabalhos futuros que utilizem à mesma metodologia deste experimento, é necessário que seja feita uma associação entre os resultados *in vitro* e os obtidos *in vivo*. Utilizando sêmen congelado com DMA Bianchi *et al.* (2008b), não encontraram diferenças nas taxas de concepção de fêmeas durante a fertilização *in vivo*, quando comparado com sêmen congelado com Glicerol.

Para que a fertilização seja considerada efetiva (tratada como fertilização monospérmica), é necessário que o espermatozóide alcance o interior do oócito para que a fertilização seja considerada efetiva (tratada como fertilização monospérmica), e que a célula ovo formada (o zigoto) tenha 2n cromossomos, além de ter condições de evoluir e desenvolver-se. Para que a célula masculina tenha condições de ultrapassar as barreiras da fertilização, é necessário que tenha condições estruturais de se ligar e interagir com a membrana do gameta feminino, sendo para isto necessária a integridade da membrana do espermatozóide.

Mesmo que as condições do processo de fertilização *in vitro* não tenha sido perfeitamente idênticas para o TPIV e para a PIV, já que para o TPIV foi utilizada a incubação dos gametas em banho-maria e na PIV em estufa, é possível presumir que o processo ocorreu de forma semelhante nos dois sistemas utilizados.

A taxa de clivagem observada na produção *in vitro* de embriões com o crioprotetor DMA foi numericamente inferior à observada com o uso do crioprotetor Glicerol, porém, não houve diferença estatística entre os dois tratamentos. O desenvolvimento embrionário obtido com o tratamento DMA também foi numericamente inferior ao demonstrado pelo tratamento Glicerol. Isto pode ser justificado pela menor taxa de fertilização monospérmica e pelo maior número médio de espermatozoides por oócito (polispermia), o que pode ter relação com poliploidia (número de cromossomos maior do que $2n$) na célula formada, uma vez que até o momento da clivagem dos zigotos os resultados não foram diferentes estatisticamente entre os tratamentos avaliados. A mesma situação justifica os resultados do M4 o qual apesar de apresentar resultados maiores ou iguais aos outros machos para as variáveis viabilidade, morfologia e motilidade, apresentou também uma maior taxa penetração - fertilização monospérmica no TPIV e o maior número médio de espermatozoides por oócito no mesmo teste, sendo que na PIV o mesmo macho apresentou a menor taxa de desenvolvimento embrionário.

5. Conclusões

O uso do crioprotetor DMA, para o congelamento de sêmen suíno proporcionou melhores resultados de motilidade e integridade de membrana dos espermatozoides, maior taxa de fertilização e maior número médio de espermatozoides que penetraram cada oócito no TPIV em relação ao Glicerol.

Portanto, considerando o conjunto de todos os testes, em comparação com o glicerol, a DMA foi associada com melhores indicadores de qualidade seminal e fertilidade *in vitro*.

Nos testes de fertilidade realizados, observou-se que, para o congelamento de sêmen suíno, o crioprotetor DMA foi melhor ou igual que o crioprotetor Glicerol, exceto para os resultados de desenvolvimento embrionário.

É possível avaliar sêmen congelado-descongelado de suínos através da realização do teste de penetração *in vitro* usando oócitos homólogos imaturos congelados-descongelados, com tempo de co-incubação dos gametas de 3 h, e um sistema submarino de incubação, sem a centrifugação da dose descongelada e a adição de substâncias que potencializem a penetração espermática.

REFERÊNCIAS

Abeydeera, L.R.; Wang, W.H.; Cantley, T.C.; Prather, R.S.; Day, B.N. Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocysts development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, 50, 747–56, 1998.

Almiñana, C.; Gil, M.A.; Cuello, C.; Roca, J.; Vazquez, J.M.; Rodrigues-Martinez, H.; Martinez, E.A. Adjustments in IVF system for individual boars: Value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. **Theriogenology**, 64, 1783-1796, 2005.

Baas, J.W.; Molan, P.C.; Shannon, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 68, 275–280, 1983.

Bergeron, A.; Manjunath, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 1338–1344, 2006.

Bergeron, A.; Crête, M.H.; Brindle, Y.; Manjunath, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, 70, 708–717, 2004.

Bianchi, I.; Calderam, K.; Maschio, E.F.; Madeira, E.M.; Rosa Ulguim, R.; Corcini, C.D.; Bongalhardo, D.C.; Corrêa, E.K.; Lucia Jr., T.; Deschamps, J.C.; Corrêa, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, 69, 632-638, 2008a.

Bianchi, I.; Calderam, K.; Maschio, E.F.; Madeira, E.M.; Ulguim, R.R.; Rambo, G.; Corrêa, E.K.; Lucia Jr., T.; Deschamps, J.C.; Corrêa, M.N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, 38, 1978-1983, 2008b.

Bordignon, V.; Deschamps, J.C.; Sechin, A.; Paludo, G.; Vivian, J.C.; Nicola, E.; Bozzato, J.S.; Gonsales, J.A.; Pimentel, C.A. Efeito da trealose sobre a motilidade, acrossomo e fertilidade do sêmen de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 20, 54-62, 1996.

Braundmeier, A.G.; Miller, D.J. Accurate molecular markers of male fertility: were do we go from here?. **IETS Newslett**, 19, 4-10, 2001.

Cabrita, E.; Alvarez, R.; Anel, L.; Rana, K.L.; Herraes, M.P. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. **Cryobiology**, 37, 245-253, 1998.

Clark, L.K.; Schinckel, A.P.; Singleton, W.L.; Einstein, M.E.; Teclaw, R.F. Use of farrowing rate as a measure of fertility of boars. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 194, 293-43, 1989.

Cordova, A.; Perez-Gutierrez, J.F.; Lleo, B.; Garcia-Artiga, C.; Alvarez, A.; Drobchak, V. et al. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0,5 and 5 ml straws. **Theriogenology**, 57, 2119-228, 2002.

Corrêa, M.N.; Lucia, T.Jr.; Bianchi, I.; Schmitt, E.; Bordignon, J.; Rech, D.C.; Peruzzo, I.A.; Deschamps, J.C. Swine semen cooled at 5°C with PIGPEL-5 extender: effects on semen quality in vitro and fertility estimators in vivo. **Animal Reproduction**, 3, 41-48, 2006.

Corrêa, M.N.; Lucia, T.Jr.; Deschamps, J.C.; Serret, C.G.; Bordignon, J.; Rambo, G. Taxa de penetração espermática *in vitro* em ovócitos suínos utilizando espermatozóides acondicionados com o diluente PIGPEL-5 à 5°C, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 28,161-169, 2004.

Corrêa, M.N.; Meincke, W.; Lucia, T.Jr.; Deschamps, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. Editora: Printpar. Pelotas, 181p., 2001.

Coy, P.; Romar, R. In vitro production of pig embryos: a point of view. **Reproduction, Fertility and Development**, 14, 275-286, 2002.

De Leeuw, F.E.; Chen, H.C.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, 27, 171-183, 1990.

De Leeuw, F.E.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, 95-104, 1991.

Drobnis, E.Z.; Crowe, L.M.; Berger, T.; Anchoroguy, T.; Overstreet, J.W.; Crowe, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, 265, 432-437, 1993.

Everson, D.P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction, Fertility and Development**, 11, 1-15, 1999.

Everson, D.P.; Thompson, L.; Jost, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and

fertility. **Theriogenology**, 41, 637-51, 1994.

Flowers, W.L. Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **Journal of Animal Science**, 80, 47-53, 2002.

Flowers, W.L.; Turner, Z.A. Relationships among motility, morphology, and fertility estimates for boar semen. **Journal of Animal Science**, 75, 223, 1997.

Foote, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, 75, 119-139, 2003.

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

Gadea, J.; Matás, C.; Lucas, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. **Animal Reproduction Science**, 54, 95-108, 1998.

Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, 39, 1-6, 2004.

Gil, M.A.; Abeydeera, L.R.; Day, B.N.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Martinez, E.A. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, 60, 767-776, 2003.

Gil, M.A.; Ruiz, M.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Day, B.N.; Martinez, E.A. Effect of short periods of sperm-oocyte coincubation during in vitro fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, 62, 544-552, 2004.

Guthrie, H.D.; Welch, G.R. Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipids disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, 17, 467-477, 2005.

Hamamah, S.; Royere, D.; Nicole, J.C.; Paquignon, M.; Lansac, J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. **Reproduction Nutrition Development**, 30, 59-64, 1990.

Hammerstedt, R.H. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courser of action. **Animal Reproduction Science**, 42, 77-87, 1996.

Hammitt, D.G.; Martin, P.A.; Callanan, T. Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. **Theriogenology**, 32, 385-399, 1998.

Harrison, R.A.P. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen

fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, 52, 271-283, 1997.

Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88, 343-352, 1990.

Hu, J.H.; Li, Q.W.; Li, G.; Chen, X.Y.; Yang, H.; Zhang, S.S.; Wang, L.Q. The cryoprotective effect on frozen–thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Asian-Aust. Journal of Animal Sciences**, 19, 486-490, 2006.

Hunter, R.H.F.; Nichol, R. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. **Gamete Research**, 21, 255-266, 1998.

Hunter, R.H.F.; Rodriguez-Martinez, H. Analysing mammalian fertilization: reservations and potential pitfalls with an in vitro approach. **Zygote**, 10, 11-1993.

Ivanova, M.; Mollova, M. Zona-penetration in vitro tests for evaluating boar sperm fertility. **Theriogenology**, 40, 397-410, 1993.

Jiang, Z.L.; Li, Q.W.; Li, W.Y.; Hua, J.H.; Zhaob, H.W.; Zhang; S.S. Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing–thawing boar sperm by neutral comet assay. **Animal Reproduction Science**, 99, 401-407, 2007.

Johnson, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. *In*: DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN. INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 1, 1985, Uppsala, Sweden. **Proceedings...** Sweden, 1985, p.199-222.

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

Karow, A.M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Augusta, Georgia, USA, 2001, Xytex Corporation. Disponível em: <<http://www.xytex.com/Cryobiology>>. Acesso em: 01 de novembro de 2008.

Killian, G.J.; Chapman, D.A.; Rogowski, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, 49, 1202–1207, 1993.

Larsson, B.; Rodriguez-Martinez, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, 60-61, 327-336, 2000.

Lewis, S.; Aitken, E.M. DNA damage to spermatozoa has impact on fertilization and pregnancy, Review. **Cell and Tissue and Research**, 322, 33-41, 2005.

Macedo, M.C.; Deschamps, J.C.; Lucia, T.Jr.; Bordignon, J.; Serret, C.G.; Rambo, G.; Pivato, I.; Schmitt, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, 92, 334-348, 2006.

Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Cerolini, S.; Penny, P.; Noble, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, 63, 411-421, 2005.

Martinez, E.A.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Cuello, C.; Gil, M.A.; Parrilla, I.; Vazquez, J.L. An update on reproductive technologies with potential short-term applications in pig production. **Reproduction in Domestic Animals**, 40, 300-309, 2005.

Martínez, E.; Vázquez, J.M.; Matás, C.; Roca, J.; Gadea, J.; Coy, P. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, 40, 547-557, 1993.

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

Miller, D.J.; Winer, M.A.; Ax, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, 42, 899-915, 1990.

Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, 63, 2372-2381, 2005.

Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, 57, 1695-1706, 2002.

Nardid, O.; Dyubko, T.; Repina, S. A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins. **Cryobiology**, 34, 107-113, 1997.

Ogier de Baulny, B.; Labbé, C.; Maise, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, 39, 177-184, 1999.

Okada, K.; Krylov, V.; Kren, R.; Fulka, J. Development of pig embryos after electro-activation and *in vitro* fertilization in PZM-3 or PZM supplemented with fetal bovine serum, **Journal of Reproduction and Development**, 52, 92-98, 2006.

Peláez, J.; Breininger, E.; Alegra, B.; Pena, F.J.; Dominguez, J.C. In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0,25 ml strauss. **Reproduction in Domestic Animals**, 41, 153-161, 2006.

Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**, 60, 677-689, 2003.

Peña, F.J.; Saravia, F.; Núñez-Martínez, I.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. **Animal Reproduction Science**, 93, 101-113, 2006.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Rampacek, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, 34, 278-283, 1972.

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

Robertson, L.; Watson, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, 77, 177-218, 1986.

Roca, J.; Carvajal, G.; Lucas, X.; Vazquez, J.M.; Martínez, E.A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, 60, 77-87, 2003.

Roca, J.; Rodríguez, M.J.; Gil, M.A.; Carvajal, G.; García, E.M.; Cuello, C.; Vazquez, J. M.; Martínez, E.A. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. **Journal of Andrology**, 26, 15-24, 2005.

Rodríguez-Martínez, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. **Reproduction in Domestic Animals**, 38, 312-318, 2003.

Saravia, F.; Wallgren, M.; Nagy, S.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, 63, 1320-1333, 2005.

Selles, E.; Gadea, J.; Romar, R.; Matas, C.; Ruiz, S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, 38, 66-72, 2003.

Somfai, T.; Kikuchi, K.; Medvedev, S.; Onishi, A.; Iwamamoto, M.; Fuchimoto, D.; Ozawa, M.; Noguchi, J.; Kaneko, H.; Ohnuma, K.; Sato, E.; Nagai, T. Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized in vitro. **Animal Reproduction Science**, 90, 307-328, 2005.

Statistix®. **Statistix® 8 analytical software**. Tallahassee, FL. 2003.

Tardif, S.; Laforest, J.P.; Cormier, N.; Bailey, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, 52, 447-459, 1999.

Thurston, L.M.; Siggins, K.; Mileham, A.J.; Watson, P.F.; Holt, W.V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biology of Reproduction**, 66, 545-554, 2002.

Tselutin, K.; Seigneurin, F.; Blesbois, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, 78, 586-590, 1999.

Ulloa Ullo, C.M.; Yoshizawa, M.; Komoriya, E.; Mitsui, A.; Nagai, T.; Kikuchi, K. The blastocyst production rate and incidence of chromosomal abnormalities by developmental stage in vitro produced porcine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, 54, 22-29, 2008.

Vazquez, J.M.; Roca, J.; Gil, M.A.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Vazquez, J.L.; Martínez, E.A. New developments in low-dose insemination technology. **Theriogenology**, 70, 1216-1224, 2008.

Vidament, M.; Daire, C.; Yvon, J.M.; Doligez, P.; Bruneau, B.; Magistrini, M.; Ecot, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, 58, 249-251, 2002.

Waberski, D.; Weitze, K.F.; Gleumes, T.; Schwarz, M.; Willmen, T.; Petzoldt, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, 42, 831-840, 1994.

Wagner, H.G.; Thibier, M. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 14, 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.77.

Watson, P.F.; Duncan, A.E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, 25, 131-142, 1988.

Watson, P.F. Cooling of spermatozoa and fertility capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, 36, 135-140, 1996.

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**

Reproduction Science 60–61, 481–492, 2000.

Way, A.L.; Griel, L.C.J.; Killian, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, 21, 213–219, 2000.

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

Xu, X.; Pommier, S.; Arbov, T.; Hutchings, B.; Sotto, W.; Foxcroft, G.R. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, 76, 3079-3089, 1998.

Yi, Y.J.; Park, C.S. Effects of sperm concentrations and culture media on fertilization and development of in vitro matured pig oocytes. **Zygote**, 12, 263-267, 2004.

Yoshioka, K.; Suzuki, C.; Tanaka, A.; Anans, I.M.K.; Iwamura, S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium, **Biology of Reproduction**, 66, 112-119, 2002.