



Acta Scientiae Veterinariae

ISSN: 1678-0345

ActaSciVet@ufrgs.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Brasil

Bianchi, Ivan; Mirapalheta Madeira, Elisângela; Schneider, Augusto; Rohrig Rabassa, Viviane; Kunde
Corrêa, Érico; Lucia Jr., Thomaz; Nunes Corrêa, Marcio

Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade
do sêmen suíno criopreservado

Acta Scientiae Veterinariae, vol. 39, núm. 1, 2011, pp. 1-7

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brasil

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289022244010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado

Effect of Different Freezing Methods, Extenders and Duration of Freezing on Quality of Frozen Boar Semen

Ivan Bianchi¹, Elisângela Mirapalheta Madeira¹, Augusto Schneider², Viviane Rohrig Rabassa², Érico Kunde Corrêa¹, Thomaz Lucia Jr.¹ & Marcio Nunes Corrêa²

ABSTRACT

Background: Artificial inseminations in swine are conducted with liquid semen cooled at 15 to 18°C for 1 to 5 d. Frozen semen is not routinely used due to its poor reproductive performance in comparison with cooled semen. In semen freezing protocols, egg yolk is added to extenders to protect the sperm membrane against cold shock. The cryoprotectant effect of egg yolk is attributed to the presence of low density lipoprotein (LDL) in its composition. Thus, replacement of egg yolk by LDL in the composition of extenders may be feasible to reduce cryoinjuries in sperm cells due to cold shock. During the process of sperm freezing the cells receive structural and functional injuries that could impair the fertilization process. Two experiments were conducted to evaluate the effect of freezing method, extenders and duration of the freezing process.

Materials, Methods and Results: In experiment 1 post-thawing motility of the Westendorf (WE) method was higher ($P < 0.05$) than Paquignon (PA) method at 10 min (46.0 ± 1.7 and 34.3 ± 1.4 , respectively) and 30 min (45.5 ± 2.1 and 32.9 ± 1.3 , respectively). Membrane integrity 10 min after thawing was higher ($P < 0.05$) in WE than PA method (45.2 ± 1.3 and 33.7 ± 2.7 , respectively). In experiment 2 motility 10 min after thawing was higher ($P < 0.05$) in BTS extender (43.0 ± 1.7) than in PIGPEL-5 (34.0 ± 1.7) and PIGPEL5-LDL (33.0 ± 1.7), as well as 30 min after thawing, being 37.0 ± 1.5 for BTS, 32.0 ± 1.5 for PIGPEL-5 and 31.0 ± 1.5 for PIGPEL5+LDL. There was a difference ($p < 0.05$) in pre-freezing motility between Short and Standard methods at 10 min (39.0 ± 0.7 and 35.0 ± 1.2 , respectively) and 30 min (35.0 ± 0.7 and 32.0 ± 0.9 , respectively), but no difference ($P > 0.05$) in membrane integrity after thawing between Short (40.3 ± 2.4) and Standard (38.7 ± 2.8) methods. The analysis was performed using the software SAS.

Discussion: Sperm motility and membrane integrity were greater for the WE method than for the PA method, which can be due to the presence of seminal plasma during cooling, since the benefits of the presence of seminal plasma proteins have been widely reported. In the PA method, the glycerol-based freezing extender was added to semen at 15°C, remaining in contact with the semen for 60 min before freezing. On the other hand, in the WE method, the glycerol-based freezing extender was added to semen only at the temperature of 5°C. Thus, the reduced sperm motility and membrane integrity observed in the PA method may have occurred as a function of the prolonged exposure to glycerol. The presence of a non-penetrating cryoprotectant (either egg yolk or LDL) during cooling at temperatures greater than 15°C did not benefit sperm motility and membrane integrity. That may have been due to the low content of both egg yolk and LDL added to the extender (2%) which may not be enough to ensure cryoprotection. The 120 min cooling period up to 15°C was efficient in stabilizing the sperm cells in the extenders, protecting them against cold shock, which allowed a substantial reduction in the period necessary to complete the freezing process. The use of WE method associated with BTS extender and Short freezing method was the most efficient protocol for boar semen cryopreservation.

Keywords: artificial insemination, cryopreservation, spermatozoa, low-density lipoprotein, egg yolk.

Descritores: inseminação artificial, criopreservação, espermatozoides, lipoproteína de baixa densidade, gema de ovo.

INTRODUÇÃO

As inseminações artificiais (IA) em suínos realizadas no mundo utilizam sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C, por um período de 1 a 5 dias [18]. A técnica de criopreservação de sêmen suíno ainda é pouco utilizada, devido aos bons resultados zootécnicos obtidos com o sêmen refrigerado que é comparável aos obtidos com a monta natural [18,24,29].

Como alternativas de diluentes utilizados podem ser citados o *Beltsville Thawing Solution* (BTS) e o PIGPEL-5. Destes, o diluente PIGPEL-5 foi desenvolvido para armazenamento do sêmen a 5°C [7].

Nos protocolos de congelamento, a gema de ovo é adicionada aos diluidores a fim de proteger a membrana da célula espermática das injúrias provocadas por baixas temperaturas, especialmente abaixo de 15°C. O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) [2]. Assim, a substituição da gema de ovo por LDL na composição dos crioprotetores utilizados convencionalmente pode ser uma alternativa, visando diminuir as alterações geradas pela criopreservação.

A maioria dos protocolos de congelamento utilizados é baseada no método (WE) [30], no qual o plasma seminal é eliminado, através de centrifugação, quando o resfriamento atinge 15°C, ou pelo método (PA) [23], no qual, imediatamente após a coleta do ejaculado (36°C), é feita a remoção do plasma seminal pela centrifugação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes métodos de congelamento, diluidores e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno submetido à criopreservação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos com a utilização de dois machos suínos cruza (Landrace x Large White) em cada trabalho. Foram coletados em cada experimento dez ejaculados de cada macho, através do método da mão-enluvada, usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel. Somente a porção do ejaculado com a maior concentração espermática foi utilizada para criopreservação e o restante descartado.

Após a coleta de cada ejaculado, a

concentração de células espermáticas foi realizada através do hematocítômetro [6]. Também foram avaliados a motilidade (0 a 100%) e o vigor (1-5) espermático por microscopia ótica e de contraste de fases em aumento de 200x [6].

Experimento 1: Efeito do método de congelação

Foram comparados dois métodos de criopreservação, Westendorf (WE) e Paquignon (PA). No método WE, imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota de 10 mL da fração rica em espermatozóides foi diluída (1:1, v/v), em tubo cônico de 50 mL, no diluente BTS. A curva de resfriamento após a diluição inicial foi de 90 min a 20°C e, após 180 min, a 15°C. Ao atingir 15°C, o tratamento foi submetido à centrifugação (800 x g por 10 min), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de espermatozóides obtido da centrifugação foi resuspenso no diluidor de resfriamento WE (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo; pH de 6,1) para uma concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozóides/mL. Após, 2 mL da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL, realizando-se o resfriamento por 90 min à 5°C. Aos 5°C, os tubos cônicos com 2 mL de espermatozóides diluídos foram ressuspensos em 1 mL do diluidor de congelamento WE (89,5% de diluidor de resfriamento WE + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 9% glicerol, v/v; pH de 6,8) para uma concentração final de $1,0 \times 10^9$ espermatozóides/mL e 3% de glicerol. Após a adição do diluidor de congelamento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 500×10^6 espermatozóides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 20 min, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C.

No método PA os tubos cônicos de 15 mL receberam alíquotas da fração rica em células do ejaculado de cada macho, até a concentração de 6×10^9 espermatozóides/tubo. Estas alíquotas foram imediatamente centrifugadas a 800 x g por 10 min, a fim de retirar o plasma seminal. Após a centrifugação, o *pellet* foi resuspenso no diluidor de resfriamento PA (5,67%, v/v, de glicose; 22,5%, v/v, de gema de ovo; pH 6,2), para atingir 4 mL e concentração de $1,5 \times 10^9$ células/mL. Foi realizada a curva de resfriamento por 120 min a 20°C e após 180 min a 15°C. Após atingir 15°C, os tubos cônicos com 4 mL de espermatozóides diluídos receberam 2 mL do

diluidor de congelamento PA (91,0% de diluidor de resfriamento PA + 9,0% glicerol, v/v; pH de 6,1), para atingirem concentração final de $1,0 \times 10^9$ espermatozoides/mL e 3% de glicerol. Feita a adição do diluidor de congelamento, os tratamentos permaneceram 60 min a 5°C. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 500×10^6 células/palheta, as quais foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C.

O descongelamento de ambos os tratamentos (WE e PA) foi realizado a 37°C por 20 s, em banho-maria com circulação de água. As palhetas foram resuspensas (1:10, v/v) em tubos cônicos de 15 mL em BTS e incubados a 37°C.

A avaliação da motilidade espermática foi realizada através de microscopia ótica (200x), 10 e 30 min após o descongelamento. A avaliação da integridade de membrana espermática foi através de sondas fluorescentes 10 min após o descongelamento. Utilizaram-se as sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP) [14]. Após a avaliação da motilidade espermática aos 10 min pós-descongelamento foi feita a avaliação da integridade de membrana em microscópio de epifluorescência (BX 51, Olympus América INC, através de excitação em filtro BW) sob aumento de 400x. Foram avaliados 200 espermatozoides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (espermatozoides corados em verde, em toda sua extensão) e lesados (espermatozoides corados em vermelho).

Experimento 2: Efeito do diluente e tempo de resfriamento

Nesta etapa do trabalho o protocolo de congelamento utilizado foi o WE conforme descrito no Experimento 1. Imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota de 10 mL da fração rica em espermatozoides foi diluída (1:1, v/v), em tubo cônico de 50 mL, em cada um dos três diluentes: BTS (sem crioprotetor), PIGPEL-5 (com crioprotetor a base de 2% de gema de ovo) e PIGPEL-5, com substituição dos 2% de gema de ovo por quantidade equivalente de LDL (PIGPEL5+LDL). A LDL foi obtida através de protocolo descrito por [22]. Para cada um dos três diluentes, foram feitas duas amostras, considerando dois tempos de resfriamento. No tempo de

resfriamento denominado Padrão, após a diluição inicial em cada um dos três diluidores de resfriamento, os frascos permaneciam 90 min a 20 °C e após 180 min a 15°C. No tempo de resfriamento denominado Curto, após a diluição inicial, os frascos permaneciam 60 min a 20°C e após 60 min a 15°C.

Ao atingirem 15°C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 min), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de espermatozoides obtido da centrifugação foi resuspenso no diluidor de resfriamento WE (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo; pH de 6,1) para uma concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Posteriormente, 2 mL da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL, realizando-se o resfriamento por 90 min à 5°C, nos dois métodos de resfriamento (Padrão e Curto). Aos 5°C, os tubos cônicos com 2 mL de espermatozoides diluídos foram resuspensos em 1 mL do diluidor de congelamento WE (89,5% de diluidor de resfriamento WE + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 9% glicerol, v/v; pH de 6,8) para uma concentração final de $1,0 \times 10^9$ espermatozoides/mL e 3% de glicerol. Após a adição do diluidor de congelamento, em cada um dos seis tratamentos de cada macho (três diluentes e dois tempos de resfriamento), o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 500×10^6 espermatozoides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C até o descongelamento.

O descongelamento das palhetas e a avaliação da motilidade e integridade de membrana foi realizado igual ao descrito no Experimento 1. As palhetas foram resuspensas nos respectivos diluentes utilizados no período de resfriamento até 15°C (BTS, PIGPEL-5 e PIGPEL5+LDL).

Análise estatística

Foi feita análise de variância com medidas repetidas para as variáveis dependentes motilidade no pré-congelamento e após o descongelamento (10 e 30 min) e sobre a integridade de membrana no descongelamento (10 min), incluindo a estimativa do efeito de cada coleta e o efeito de cada macho dentro de cada tratamento. A comparação de médias foi feita através do método LSD (*least significant difference*),

usando o procedimento GLM (*general linear models*) [26].

RESULTADOS

Efeito do método de congelamento

A motilidade no pré-congelamento para o método WE ($68,3 \pm 2,1$) foi superior ($P < 0,05$) a do método PA ($52,4 \pm 2,9$), como pode ser observada na (tabela 1).

Esta superioridade do método WE também foi observada após o descongelamento ($P < 0,05$) aos 10 min ($46,0 \pm 1,7$ vs $34,3 \pm 1,4$) e aos 30 min ($45,5 \pm 2,1$ vs $32,9 \pm 1,3$). Em relação ao percentual de espermatozoides que apresentavam membrana íntegra após o descongelamento, o método WE foi superior ($P < 0,05$) ao método PA ($45,2 \pm 1,3$ vs $33,7 \pm 2,7$, respectivamente). A correlação observada entre as técnicas de integridade de membrana por fluorescência (CFDA e IP) e motilidade pela microscopia óptica foi altamente positiva e significativa ($r = 0,73$, $P < 0,05$).

Efeito do diluente e tempo de resfriamento

Não houve interação entre os diluentes e as curvas de resfriamento utilizadas ($P > 0,05$). Antes do congelamento, observou-se que o sêmen diluído sem a presença de crioprotetor extracelular durante a curva de resfriamento até 15°C (BTS) apresentou motilidade superior ($P < 0,05$) aos tratamentos que continham crioprotetor, tanto PIGPEL-5 como o PIGPEL5+LDL.

A substituição da gema de ovo por LDL não influenciou a motilidade pré-congelamento ($P > 0,05$). Ainda, a motilidade aos 10 e 30 min após o descongelamento foi superior ($P < 0,05$) para o tratamento utilizando o diluente BTS durante o resfriamento do sêmen até 15°C (Tabela 2), sendo que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL5+LDL na curva de resfriamento até 15°C nos dois momentos da avaliação pós-descongelamento (Tabela 2).

Tabela 1. Motilidade espermática do sêmen suíno pré e pós-congelamento de acordo com o método de congelamento utilizado.

Metodologia congelamento	Motilidade Espermática			
	Pré-congelamento	Pós-descongelamento		
		10 min	30 min	
	Média \pm EPM*	Média \pm EPM*	Média \pm EPM*	
Westendorf	$68,3 \pm 2,1^a$	$46,0 \pm 1,7^a$	$45,5 \pm 2,1^a$	
Paquignon	$52,4 \pm 2,9^b$	$34,3 \pm 1,4^b$	$32,9 \pm 1,3^b$	

^{a,b}Médias na coluna com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$). *EPM (Erro Padrão da Média).

Tabela 2. Motilidade espermática nos diferentes momentos de avaliação do sêmen suíno de acordo com o diluente utilizado durante o resfriamento até 15°C .

Diluente	Motilidade Espermática		
	Pré-congelamento	Pós-descongelamento	
		10 min	30 min
	Média \pm EPM*	Média \pm EPM*	Média \pm EPM*
BTS	$68 \pm 0,8^a$	$43 \pm 1,7^a$	$37 \pm 1,5^a$
PIGPEL-5	$62 \pm 0,8^b$	$34 \pm 1,7^b$	$32 \pm 1,5^b$
PIGPEL5+LDL	$63 \pm 0,8^b$	$33 \pm 1,7^b$	$31 \pm 1,5^b$

^{a,b}Médias na coluna com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$). *EPM (Erro Padrão da Média).

Na pré-congelção, a motilidade espermática não diferiu ($P>0,05$) entre o tempo de refrigeração Padrão ($64,2 \pm 1,5$) e o Curto ($64,3 \pm 1,9$). Após descongelção foi observada diferença na motilidade ($P<0,05$) entre os tempos de refrigeração Curto e Padrão aos 10 min ($39 \pm 0,7$ vs $35 \pm 1,2$, respectivamente), e aos 30 min ($35 \pm 0,7$ vs $32 \pm 0,9$, respectivamente). Para integridade de membrana não houve diferença ($P>0,05$) entre o tempo de refrigeração Padrão ($38,7 \pm 2,8$) e o Curto ($40,3 \pm 2,4$) aos 10 min após descongelção.

Na avaliação da integridade de membrana aos 10 min após descongelção, não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos BTS e PIGPEL5+LDL ($48 \pm 2,4$ vs $47 \pm 1,9$, respectivamente), no entanto, ambos foram superiores ($P<0,05$) aos resultados de integridade do diluente PIGPEL-5 ($38 \pm 2,1$).

DISCUSSÃO

O fato de que o método WE tenha apresentado resultados de motilidade e integridade de membrana superior ao método PA pode ser atribuída à presença de plasma seminal durante o período de resfriamento. Efeitos benéficos das proteínas do plasma seminal são relatados em vários trabalhos [5,12]. Há diferenças nas proteínas do plasma seminal de touros com boa e má resposta a congelção, sugerindo o estudo dessas proteínas do plasma como marcadores de congelabilidade [15], sendo que o mesmo pode ocorrer em suínos [27,28].

No entanto, este efeito é controverso, pois existem relatos de que a presença de plasma seminal é associada com a maior sensibilidade do espermatozóide suíno ao choque térmico [8], ou que a remoção deste não interfere na viabilidade pós-descongelção [9]. Ainda existem relatos de que o plasma seminal adicionado à fração rica do ejaculado, não teria influência sobre a qualidade do sêmen [4].

Em trabalho utilizando suínos miniatura, observou-se que o plasma seminal contém fatores que modificam a célula espermática antes do congelamento e reduzem a capacidade de penetração no ovócito após o congelamento [18]. Há efeito prejudicial do plasma seminal especialmente em espermatozoides armazenados por pelo menos 6 h antes da criopreservação [21].

Por outro lado, é importante ressaltar que no método PA, o diluidor de congelamento contendo

glicerol foi adicionado ao sêmen a 15°C , permanecendo durante 60 min antes que do ejaculado ser congelado. Já no método WE, o diluidor de congelamento que contém o glicerol foi adicionado ao sêmen a 5°C e, imediatamente após, as amostras foram congeladas. Portanto, a exposição prolongada ao glicerol no método PA, mesmo que a concentração final nos dois métodos (WE e PA) tenha sido a mesma (3%) pode ter prejudicado a motilidade e a integridade de membrana plasmática.

O glicerol em determinadas concentrações tem um potencial efeito citotóxico na célula espermática em detrimento das suas características benéficas como crioprotetor [29], sendo que protocolos de criopreservação de sêmen suíno a concentração máxima final de glicerol utilizada é de 3% [9,25,30]. Assim, além da comprovada ação maléfica da concentração de glicerol, possivelmente o tempo de exposição também seja prejudicial à viabilidade da célula espermática.

Também, o melhor resultado de motilidade espermática obtido neste estudo é comparável, ou mesmo superior [9,13,25,31].

A presença de crioprotetor extracelular (gema de ovo ou LDL) durante o período de resfriamento acima de 15°C não proporcionou a melhora esperada na motilidade e integridade de membrana do sêmen submetido à criopreservação. A LDL presente na gema do ovo promove a entrada de fosfolípido e colesterol na membrana [2,19], além de formar um complexo com as proteínas do plasma seminal, prevenindo a saída de fosfolípido e colesterol da membrana espermática. Os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL5+LDL, que possuem crioprotetor extracelular em sua composição, possivelmente não influenciaram a viabilidade espermática a 5°C e no pós-congelamento, talvez pelo baixo conteúdo de gema de ovo e LDL utilizados na composição do diluente (2%), o que não possibilitou intensificar os mecanismos de proteção [2,19]. Portanto, uma maior inclusão de gema de ovo e LDL pode ser necessária, para aumentar a eficácia destes diluentes.

Uma melhora de 5% e 4% na integridade de membrana para os períodos de incubação de 10 e 20 h a 17°C , respectivamente, em relação à incubação a 15°C por 3 h [10]. A incubação prévia ou diminuição lenta da temperatura foi associada com redução na sensibilidade do ejaculado ao resfriamento a 5°C [17].

Porém, não foram observados efeitos na motilidade pós-congelamento em função de incubação pré-congelamento por 2,5, 3,5 ou 26h [11]. Também não foram observados efeitos sobre a motilidade de amostras de sêmen incubado a 15°C por 3 ou 24h, ou sobre as taxas de prenhez obtidas posteriormente com o uso do sêmen [13]. Neste estudo, o tempo de 120 min para a refrigeração até 15°C foi suficiente para que as células espermáticas se estabilizassem no diluente, adquirindo resistência ao choque térmico, o que proporciona uma sensível redução no tempo necessário para a execução do processo de congelamento. Além disso, devido ao menor tempo de

permanência do sêmen em temperatura acima de 15°C, a produção de catabólitos será menor, em função da redução no metabolismo celular, havendo menor risco de proliferação bacteriana [1].

CONCLUSÃO

O método de congelamento PA foi associado com redução na motilidade espermática e integridade de membrana do sêmen suíno descongelado. Também, a presença de crioprotetor externo (gema de ovo ou LDL) no diluente utilizado durante a curva de refrigeração e a redução do tempo necessário para atingir 15°C, não influenciaram a motilidade e integridade do sêmen na descongelação.

REFERÊNCIAS

- 1 Althouse G.C. & Lu K.G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 63(2): 573-584.
- 2 Bergeron A., Crête M.H., Brindle Y. & Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70(3): 708-717.
- 3 Bianchi I., Calderam K., Maschio E.F., Madeira E.M., da Rosa Ulguim R., Corcini C.D., Bongalhardo D.C., Corrêa É.K., Lucia Jr. T., Deschamps J.C. & Corrêa M.N. 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*. 69(5): 632-638.
- 4 Buhr M.M., He L. & Kasimanickam V. 2000. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.61-69.
- 5 Castellini C., Lattaioli P., Moroni M. & Minelli A. 2000. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 63(1): 275-282.
- 6 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- 7 Corrêa M.N., Lucia Jr. T., Bianchi I., Schmitt E., Bordignon J., Rech D.C., Peruzzo I.A. & Deschamps J.C. 2004. 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(1): 161-169.
- 8 Dalimata A.M. & Graham J.K. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology*. 49(4): 831-841.
- 9 Eriksson B.M., Petersson H. & Rodriguez-Martinez H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology*. 58(6): 1065-1079.
- 10 Eriksson B.M. & Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws. *Animal Reproduction Science*. 63(1): 205-220.
- 11 Casado P.G., Del Val P.M., Yubero C.D., Sánchez R.S. & Sáiz F.C. 2001. Influence of equilibration time on boar spermatozoa membranes during the freezing process. In: *Proceedings of the 6th International Conference on Pig Reproduction* (Missouri-Columbia, U.S.A.). p.52.
- 12 Garner D.L., Thomas C.A., Gravance C.G., Marshall C.E., Dejarnette J.M. & Allen C.H. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*. 56(1): 31-40.
- 13 Guthrie H.D. & Welch G.R. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*. 63(2): 396-410.
- 14 Harrison R.A.P. & Vickers S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88(1): 343-352.
- 15 Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Souza D.O., Wald V.B., Tramontina F. & Mattos R.C. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 61(2): 253-266.

I. Bianchi, E. Madeira, A. Schneider, et al. 2011. Efeitos de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempo de resfriamento... *Acta Scientiae Veterinariae*. 39(1): 949.

- 16 Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P. & Maxwell W.M. 2000.** Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1): 143-172.
- 17 Katzer L.H., Bernardi M.L., Padilha A.P., Leeznieski L.F., Bortolozzo F.P. & Wentz I. 2001.** Sensitivity of boar semen according to incubation time and cooling rate. In: *Proceedings of the 6th International Conference on Pig Reproduction* (Missouri-Columbia, U.S.A.). p.55.
- 18 Kawano N., Shimada M. & Terada T. 2004.** Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*. 61(2): 351-364.
- 19 Manjunath P., Nauc V., Bergeron A. & Ménard M. 2002.** Major Proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*. 67(4): 1250-1258.
- 20 Medeiros A.S.L., Gomes G.M., Carmo M.T., Papa F.O. & Alvarenga M.A. 2002.** Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 58(2): 273-276.
- 21 Moore A.I., Squires E.L. & Graham J.K. 2005.** Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 63(9): 2372-2381.
- 22 Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D. & Anthon M. 2002.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57(6): 1695-1706.
- 23 Paquignon M., Mercounis D. & Courot M. 1974.** Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude *in vitro*. *Journées de la Recherche Porcine en France*. 6(1): 71-76.
- 24 Pursel V.G. & Johnson L.A. 1975.** Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 40(1): 99-102.
- 25 Roca J., Carvajal G., Lucas X., Vazquez M.J. & Martinez A.E. 2003.** Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 60(1): 77-87.
- 26 SAS®.** SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). 1999. Cary: SAS Institute Inc.
- 27 Thurston L.M., Siggins K., Mileham J.A., Watson F.P. & Holt V.W. 2002.** Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction*. 66(3): 545-554.
- 28 Thurston L.M., Watson F.P., Mileham J.A. & Holt V.W. 2001.** Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*. 22(1): 382-394.
- 29 Watson P. F. 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60(1): 481-492.
- 30 Westendorf P., Richter L. & Treu H. 1975.** Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 82(1): 261-267.
- 31 Wongtawan T., Saraiva F., Wallgren M., Caballero I. & Rodríguez-Martínez H. 2006.** Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*. 65(4): 773-787.