

VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN CONGELADO DE SUÍNOS DA RAÇA PIAU AVALIADA PELO TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA

[Spermatic viability of cryopreserved semen of Piau swine breed analyzed by thermo resistant test]

Maurício Hoshino da Costa Barros¹, Hugo Hideki Shiomi², Lincoln da Silva Amorim², Jeanne Broch Siqueira³, Rogério Oliveira Pinho^{4*}, Daniel Mendonça de Araújo Lima³, Paulo Sávio Lopes⁴, Simone Eliza Facioni Guimarães⁴, José Domingos Guimarães²

¹ Empresa Minitube do Brasil

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

³ Universidade Federal de Alegre, Departamento de Veterinária, Alegre, Espírito Santo, Brasil

⁴ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

RESUMO - O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de três protocolos de criopreservação de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de suínos da raça Piau, avaliados por meio do teste de termorresistência (TTR). Para o congelamento, os ejaculados foram fracionados e submetidos aos seguintes tratamentos: protocolo 1 - preconizado por Füst et al. (2005), modificado quanto aos meios diluentes; protocolo 2 - preconizado por Füst et al. (2005), modificado quanto à curva de resfriamento; e protocolo 3 - preconizado por Ohata et al. (2001). Após o descongelamento o sêmen foi submetido ao teste de termo-resistência (38 °C por 2 horas), procedendo-se avaliações de motilidade e vigor espermáticos a cada 30 minutos. As médias registradas para motilidade imediatamente após o descongelamento foram de 20,9±12,4; 29,5±10,9 e 49,5±12,1%; respectivamente para os protocolos 1, 2 e 3. Os resultados do TTR evidenciam queda gradual dos parâmetros de MOT ao longo de 2 horas de duração nos três protocolos utilizados. Observou-se que os valores médios de motilidade espermática verificados no protocolo 3 foram maiores que as registradas nos outros dois protocolos, em todos os períodos avaliados. Do mesmo modo, a porcentagem média de espermatozoides móveis obtidos no protocolo 2 foi maior que a obtida no protocolo 1 nos primeiros 30 minutos de avaliação, sendo que após este período não houve diferença entre eles. Com relação ao vigor espermático entre os protocolos, verificou-se que o protocolo 3 apresentou resultados melhores em relação aos demais. As melhores médias para o protocolo 3, demonstram a superioridade do mesmo na criopreservação das células espermáticas dos animais do presente estudo.

Palavras-Chave: criopreservação de sêmen, *Sus scrofa*, testes complementares

ABSTRACT - The objective of this study was to verify three protocols of semen cryopreservation on spermatic viability after thawing from Piau swine breed, by thermo resistant test (TRT). To freezing, the ejaculates was split and submitted to three protocols: Protocol 1 - proposed by Furst et al. (2005), altered by diluent media; Protocol 2 - proposed by Furst et al. (2005), altered by cooled curve; and Protocol 3 - proposed by Ohata et al. (2001). After thawing, semen was submitted to TRT (37 °C during 2 hours), and sperm motility was analyzed at 30 minutes of interval. Motility after thawing was 20.9±12.4, 29.5±10.9 and 49.5±12.1%, respectively to P1, P2 and P3. The TRT results show gradually decrease of motility and vigor along 2 hours of test procedure utilized. It was observed that the mean values of sperm motility observed in protocol 3 were higher than those recorded in the other two protocols in all periods. Similarly, the mean percentage of motile spermatozoa obtained in protocol 2 was higher than that obtained in protocol 1 in the first 30 minutes of evaluation, and after this period there was no difference between them. Regarding the sperm vigor between protocols, it was found that the protocol 3 showed better results than the other. The protocol 3 tested by Piau boars show highest values in cellular semen cryopreservation.

Keywords: complementary tests, semen cryopreservation, *Sus scrofa*

* E mail: rogerio_op@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

No Brasil, dentre as raças suínas nativas catalogadas como de alto risco de extinção, a raça Piau (*Sus scrofa*) é considerada a melhor e mais importante raça naturalizada nacional (Cavalcanti, 1984), sendo a única raça nativa que ainda existe no país. Entretanto, a maioria dessas raças, por cruzamentos absorventes ou por substituição, deu lugar a outras que, por serem mais produtivas e melhoradas geneticamente, contribuíram para redução apreciável das populações de animais nativos (Pereira, 2004; Sollero et al., 2009).

Apesar do grande potencial de tecnologias como a criopreservação de sêmen e sexagem dos espermatozoides para a melhoria de diversos aspectos da produção de suínos, a inseminação artificial com sêmen fresco ou resfriado são atualmente as técnicas mais utilizadas em escala comercial na indústria de suínos. Segundo Parrila et al. (2009), o menor desempenho reprodutivo do sêmen criopreservado é a razão para tal uso limitado. No entanto, quando métodos adequados de criopreservação são utilizados em sêmen de suínos, taxas de motilidade de 35-56% têm sido obtidas (Bwanga et al. 1991; Eriksson et al. 2002; Peláez et al., 2006), sugerindo que bons desempenhos podem ser alcançados nas condições descritas nos protocolos utilizados pelos autores.

Após o congelamento, análises quantitativas são realizadas *in vitro* no intuito de prever o potencial fertilizante do sêmen. Dentre eles, o teste de termorresistência (TTR), foi desenvolvido para a avaliação da longevidade potencial de partidas de sêmen congelado de bovinos, posteriormente adaptado para as demais espécies. Consiste na avaliação da longevidade dos espermatozoides após a descongelação promovendo uma simulação parcial *in vitro* do processo *in vivo* que o sêmen teria no interior do trato reprodutor da fêmea. Em suínos e humanos, estimativas da motilidade após a incubação a temperaturas corporais têm dado melhores indicativos da capacidade fecundante do que simples avaliações da motilidade imediatamente após a descongelação (Thirumala et al. 2003; Kashiwazaki et al. 2006).

Na espécie suína, alguns autores têm utilizado o TTR para avaliar a fertilidade do sêmen congelado/descongelado em diversos protocolos de congelamento, incubando o sêmen a 37 °C por um período de 2 a 4 horas (Larsson e Einarsson, 1976;

Bwanga et al. 1991; Ohata et al. 2001; 2005; Peláez et al. 2006; Roca et al., 2010).

A motilidade e o vigor espermáticos são critérios importantes na avaliação da qualidade seminal, pois os espermatozoides precisam estar móveis e obterem hiperatividade, quando na tuba uterina, para alcançar o ovócito e penetrar nas suas camadas de revestimento. Além disso, estes parâmetros são de grande importância e podem revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermiogênese (CBRA, 1998). A motilidade é um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no ovócito. Por ser um exame simples, rápido, de baixo custo e bom indicador da integridade e funcionalidade das membranas (Gadea, 2005), a avaliação subjetiva da motilidade espermática é o principal parâmetro utilizado para avaliar os ejaculados.

Devido à baixa fertilidade, grande variabilidade na resposta dos machos suínos ao congelamento e aos altos custos por dose produzida, a inseminação artificial com sêmen congelado tende a se restringir à exportação de sêmen entre países e à formação de bancos de sêmen de raças ou linhagens de alto valor genético, ou que se encontram em via de extinção ou em risco sanitário. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de três protocolos de criopreservação de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de suínos da raça Piau (*Sus scrofa*), avaliados por meio do teste de termorresistência.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Granja de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa no período de um ano (março de 2008 à março de 2009). Foram utilizados 22 ejaculados de cinco varrões da raça Piau, com idades variando de 1 a 2 anos, onde de 3 animais foram coletados 5 ejaculados e de dois animais foram coletados 4 e 3 ejaculados. Os animais foram criados em condições intensivas, em baias individuais de 3 x 4 m (12m²) por varrão. Foram fornecidos 2 kg/dia de ração balanceada para reprodutores, sendo oferecido 1 Kg pela manhã e 1 Kg pela tarde.

As coletas de sêmen foram realizadas semanalmente utilizando o método da estimulação com a mão enluvada (Hancock e Hovell, 1959) com auxílio de

um manequim móvel. O ejaculado total foi coletado em copos plásticos descartáveis de 700 mL, devidamente esterilizados, protegidos em embalagens térmicas previamente aquecidas a 38 °C, com dupla camada de gases, fixados ao copo com barbante, para reter a fração gelatinosa do sêmen. O sêmen *in natura* foi mantido em banho-maria, a 32 °C, para avaliação das análises laboratoriais de motilidade (MOT) e vigor espermático (VIG). Posteriormente, os ejaculados foram fracionados e submetidos aos seguintes tratamentos: o protocolo 1 (P1) que utilizou o método de congelamento preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto aos meios diluentes; o protocolo 2 (P2) que utilizou o método preconizado por Fürst et al. (2005), modificado quanto à curva de resfriamento; e o protocolo 3 (P3) que utilizou o método preconizado por Ohata et al. (2001).

Para o P1, o ejaculado foi diluído 1:1 em BTS (*Beltsville Thawing Solution*) e imediatamente centrifugado (800 G por 10 minutos). Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os espermatozoides no diluente de resfriamento (DR) (80 mL de solução de lactose a 11%; 20 mL de gema de ovo). A concentração de espermatozoides no pellet foi estimada utilizando a câmara de Newbauer Improved e, com isso, foi determinado o volume de ressuspensão do diluente de congelamento (DC), até atingir uma concentração final de 800×10^6 espermatozoides/mL ou 200×10^6 /palheta, de modo que a quantidade de DC fosse equivalente a um terço do volume de sêmen anteriormente diluído com o DR, para então obter-se uma concentração final de 2% de glicerol.

Imediatamente após ter sido acrescentado o DC (72,5 mL de lactose a 11%; 20 mL de gema de ovo; 6 mL de glicerol e 1,5 mL de Orvus-es-paste-Equex), o sêmen foi envasado em palhetas finas (0,25 mL). Posteriormente utilizou-se uma curva de resfriamento, de tal forma que as palhetas foram colocadas em tubo de ensaio com tampa e capacidade de 20 mL. Em seguida, o tubo de ensaio revestido por um retil (saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico de 240 mL (mamadeira plástica) contendo 120 mL de álcool absoluto, preenchendo a metade do tubo de ensaio. O recipiente com o sêmen foi colocado na posição horizontal em geladeira, com temperatura interna de 4-5 °C, por 35 minutos.

Após esse tempo, o tubo de ensaio foi retirado do recipiente plástico e mantido na geladeira por mais 25 minutos. Para o congelamento do sêmen, as palhetas foram colocadas, na posição horizontal, sobre uma raque a 5 cm acima do nitrogênio líquido,

mantidas em vapor de nitrogênio (-80 a -120 °C) por 15 minutos e, finalmente, submersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Os procedimentos realizados para o P2 foram semelhantes ao P1 com uma modificação apenas: foi adotado um período curto de 90 minutos de equilíbrio imediatamente após a diluição inicial do sêmen com o BTS, para estabilização a 22-26 °C, antes da centrifugação, com o intuito de aumentar a viabilidade espermática pós-descongelamento.

No P3, o ejaculado foi diluído em 1:1 em BTS, a 32°C, e mantido à temperatura ambiente (22-26 °C) por 90 minutos. Posteriormente foi resfriado a 15 °C (em geladeira adaptada com temperatura controlada) por 150 minutos e, ao final deste período, foi centrifugado (800 G por 10 minutos). Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os espermatozoides com DR (80 mL de solução de lactose a 11 %; 20 mL de gema de ovo). A concentração de espermatozoides no pellet foi estimada utilizando a câmara de Newbauer Improved e, com isso, foi determinado o volume de ressuspensão do DR. O pellet ressuspendido foi mantido a 5 °C por 90 minutos e, após esse período, foi adicionado o DC (72,5 mL de lactose a 11%; 20 mL de gema de ovo; 6 mL de glicerol e 1,5 mL de Orvus-es-paste-Equex). Imediatamente após ter sido acrescentado o DC, foi realizado o envase em palhetas finas (0,25 mL), as quais foram mantidas em vapor de nitrogênio (-80 a -120 °C) por 15 minutos e posteriormente submersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

O descongelamento do sêmen foi realizado da mesma maneira para os três protocolos de congelamento, por meio da agitação da palheta com uma pinça, em banho-maria a 38 °C, por 20 segundos. Posteriormente, a palheta foi seca com papel toalha, as extremidades cortadas com uma tesoura e seu conteúdo ressuspendido com 1,25 mL de diluente BTS, a 38 °C. Após o descongelamento, as amostras de sêmen dos três protocolos foram mantidas à temperatura de 38 °C e avaliadas quanto à MOT, VIG para serem posteriormente submetidas ao TTR.

O TTR foi realizado pela incubação do sêmen pós-descongelamento em 1,25 mL de BTS em banho-maria à 38 °C, por 120 minutos, avaliando-se motilidade e vigor espermáticos em intervalos de 30 minutos. A motilidade espermática progressiva retilínea (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de 0 a 5) foram realizadas adicionando 10 µL de sêmen em lâmina de microscopia posteriormente cobertas com lamínula

pré-aquecidas a 38 °C, respectivamente (CBRA, 1998).

A análise estatística foi realizada empregando o programa estatístico SAEG 9.1 (UFV, 2007). Estatística descritiva (média, desvio-padrão) foi utilizada para todas as variáveis estudadas (MOT, VIG). Os dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Os dados quantitativos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), verificando o efeito de protocolos, e quando houve significância pelo teste “F”, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro. Parâmetros que não atenderam as premissas da ANOVA foram avaliados pela análise não-

paramétrica, com comparação de médias pelo teste de Kruskal Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da motilidade espermática e vigor espermático pós-descongelamento avaliados durante o TTR estão expressos nas Tabelas 1 e 2. As médias registradas para MOT e VIG do sêmen imediatamente após a descongelamento foram de 20,9±12,4; 29,5±10,9 e 49,5±12,1%; e de 2,5±0,5; 2,9±0,4 e 3,4±0,4, respectivamente, para os protocolos 1, 2 e 3.

Tabela 1: Motilidade espermática avaliada durante o teste de termorresistência nos três protocolos de congelamento do sêmen de cachorros da raça Piau (*Sus scrofa*).

Protocolos	Tempo de incubação				
	Pós descongelamento	30	60	90	120
1	20,9±12,4 ^{aA}	14,3±11,0 ^{aB}	10,7±10,8 ^{aBC}	7,5±8,6 ^{aC}	5,2±6,3 ^{aC}
2	29,5±10,9 ^{bA}	22,7±9,7 ^{bB}	16,6±10,0 ^{aC}	13,0±7,8 ^{aC}	9,8±6,6 ^{aC}
3	49,5±12,1 ^{cA}	42,3±12,5 ^{cAB}	36,6±13,3 ^{bBC}	28,6±13,6 ^{bCD}	23,0±13,0 ^{bD}

^{a,b,c} = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). ^{A,B,C,D} = Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). $x \pm s$: média e desvio padrão.

Tabela 2: Vigor espermático avaliado durante o teste de termorresistência nos três protocolos de congelamento do sêmen de cachorros da raça Piau (*Sus scrofa*).

Protocolos	Tempo de incubação				
	Pós descongelamento	30	60	90	120
1	2,5±0,5 ^{aA}	1,9±0,9 ^{aAB}	1,6±0,9 ^{aBC}	1,3±1,1 ^{aBC}	1,2±1,0 ^{aC}
2	2,9±0,4 ^{bA}	2,5±0,4 ^{aAB}	2,1±0,8 ^{aBC}	1,9±0,7 ^{aC}	1,8±0,7 ^{abC}
3	3,4±0,4 ^{bA}	3,2±0,5 ^{bAB}	2,9±0,4 ^{bBC}	2,4±0,6 ^{bC}	2,2±0,8 ^{bC}

^{a,b,c} = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). ^{A,B,C,D} = Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). $x \pm s$: média e desvio padrão.

Foram registradas diferenças nos parâmetros avaliados em relação ao tempo de incubação e ao protocolo utilizado. Observou-se que os valores médios de motilidade espermática verificados no protocolo 3 foram maiores ($P < 0,05$) que as registradas nos outros dois protocolos, em todos os períodos avaliados. Do mesmo modo, a porcentagem média de espermatozoides móveis obtidos no

protocolo 2 foi maior ($P < 0,05$) que a obtida no protocolo 1 nos primeiros 30 minutos de avaliação, sendo que após este período não houve diferença entre eles. Com relação ao vigor espermático entre os protocolos, verificou-se que o protocolo 3 apresentou resultados melhores ($P < 0,05$) em relação aos demais.

Entre os protocolos 1 e 2, verificou-se que a simples introdução de um período de equilíbrio de 90 minutos, antes da etapa de centrifugação do protocolo 1, resultou em melhora na motilidade e vigor espermáticos imediatamente após o descongelamento ($P < 0,05$). Contudo, os valores médios obtidos com o uso do protocolo 3, demonstraram a superioridade do mesmo na criopreservação das células espermáticas dos animais do presente estudo, sendo o único protocolo que apresentou ao final do teste características aptas para o uso do sêmen em programas de inseminação artificial, segundo o CBRA (1998). Segundo Pursel e Park (1985), a redução lenta da temperatura do sêmen suíno, após a coleta e antes de submetê-lo a temperaturas inferiores a 15 °C (tempo de equilíbrio) é necessária antes de submeter os espermatozoides ao congelamento, de modo a diminuir os efeitos deletérios do choque térmico sobre os espermatozoides, aumentando a sua viabilidade após o descongelamento. Apesar dos protocolos 2 e 3 terem utilizado o mesmo tempo de equilíbrio (90 minutos), o P3 apresentou melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelamento, sugerindo que a curva de resfriamento utilizada de acordo com metodologia preconizada por Fürst et al. (2005) em sêmen se eqüinos não foi eficaz para o congelamento de sêmen de suínos.

Resultados de motilidade pós-descongelamento superiores ao deste estudo foram registrados por Ohata et al. (2001), Ohata et al. (2005) e Bianchi et al. (2008). Ohata et al. (2001) registraram valores de $60,2 \pm 1,6\%$ para MOT pós-descongelamento, utilizando o mesmo protocolo de congelamento e tempo de equilíbrio (90 minutos) do protocolo 3 deste estudo. Quando aumentaram o tempo de equilíbrio de 90 minutos para 20 horas, os mesmos autores registraram valores de $53,3 \pm 2,1\%$ para esta característica. Ohata et al. (2005) registraram valores médios de $51,4 \pm 9,5\%$ após o descongelamento para motilidade espermática em protocolo utilizando tempo de equilíbrio de 90 minutos, e de $51,4 \pm 9,9\%$ para o período longo de incubação de 20 horas. Bianchi et al. (2008) registraram valores de 53 e 65% para MOT, respectivamente quanto utilizaram o glicerol a 3% e a dimetilacetamida a 5% como crioprotetores. Estes resultados foram obtidos de animais considerados como de linhagens comerciais e podem ser perfeitamente comparados aos do presente estudo, demonstrando que suínos da raça Piau possuem padrão semelhante de qualidade seminal pós-descongelamento.

Os resultados do TTR evidenciaram uma queda gradual dos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos ao longo de 3 horas de duração do teste

como demonstram as tabelas. Para a MOT, constata-se que até o período de 30 minutos, os três protocolos apresentam diferença significativa entre si ($P < 0,05$), porém após esse período, os protocolos 1 e 2 mantêm valores semelhantes ($P > 0,05$), enquanto que o protocolo 3 mantém valores superiores, até o final do teste, com 120 minutos. Para o vigor espermático, verifica-se que apenas no momento zero os valores dos protocolos 2 e 3 são iguais, e ambos, superiores ao do protocolo 1 ($P < 0,05$). A partir do período de 30 minutos até o final do teste, com 120 minutos, os valores obtidos no protocolo 3 permaneceram superiores aos dos protocolos 1 e 2 ($P < 0,05$), sendo estes dois semelhantes até o término do teste ($P > 0,05$).

Esta queda na motilidade espermática progressiva observada ao final do TTR pode ser decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides. Segundo Harrison e Vickers (1990) é possível que a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos, envolvidos com a fosforilação oxidativa e com a motilidade espermática, seja insuficiente, embora as mitocôndrias mantenham sua capacidade de produzir energia.

A diferença observada quanto à resistência do sêmen durante o TTR nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para o resultado de motilidade entre os protocolos pode ser explicada pelo fato de ter havido variações quanto à congelabilidade do sêmen entre os protocolos, ou ainda, entre os ejaculados dos diferentes varrões utilizados. Segundo Bortolozzo et al. (2005), a grande variabilidade na resposta dos machos suínos ao congelamento constitui-se numa das diversas limitações ao emprego comercial do sêmen congelado na suinocultura moderna. Quando agruparam os ejaculados quanto sua qualidade em bons, moderados e pobres, Roca et al. (2010) registraram valores superiores ao deste estudo com médias de $54,9 \pm 0,9$; $32,8 \pm 1,1$ para MOT após 30 minutos de incubação, e de $17,0 \pm 2,4\%$ e de $27,0 \pm 1,0$; $25,0 \pm 0,8$ e $9,8 \pm 1,1\%$ para MOT após 150 minutos de incubação, respectivamente para os grupos de ejaculados classificados como bons, moderados e pobres. Resultados semelhantes foram registrados por Larsson e Einarsson (1976) que observaram mudanças na resposta ao TTR (3 horas de incubação a 37 °C) entre machos suínos, com menores valores obtidos dos machos com baixo potencial para congelabilidade.

Os resultados de motilidade e vigor espermático imediatamente após o descongelamento tiveram um reflexo positivo sobre o TTR, ou seja, os protocolos que apresentaram maior motilidade pós-

descongelamento, foram os mesmos que obtiveram maior longevidade durante o teste.

CONCLUSÕES

Os valores médios obtidos com o uso do protocolo 3, demonstram a superioridade do mesmo na criopreservação das células espermáticas dos animais do presente estudo, sendo o único protocolo onde, ao final do teste, os espermatozoides apresentaram características aptas para o uso do sêmen em programas de inseminação artificial, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Além disto, os valores registrados nos diferentes tempos de avaliação no teste de termo-resistência demonstram não ser necessário o emprego do teste por 120 minutos, uma vez que, após 90 minutos, os parâmetros já não apresentam diferença estatística.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e FAPEMIG pelo financiamento durante o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Bianchi, I., Calderam, K., Maschio, E.F., Madeira, E.M., Ulguim, R.R., Rambo, G., Corrêa, E.K., Lucia Junior, T., Deschamps, J.C. & Corrêa, M.N. 2008. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. *Ciência Rural*, 38(7):1978-1983.
- Bortolozzo, F.M., Wentz, I., Bennemann, P.E., Bernardi, M.L., Wollmann, E.B., Ferreira, F.M. & Neto, G.B. 2005. *Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. Porto Alegre, Pallotti, 185.
- Bwanga, C.O., Einarsson, S. & Rodríguez-Martínez, H. 1991. Cryopreservation of boar semen: II. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet Scand*, 32:455-461.
- Cavalcanti, S.S. 1984. *Produção de Suínos*. Campinas, SP: Instituto Campeiro de Ensino Agrícola, 453.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal – CBRA. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. 2ª ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.
- Eriksson, B.M., Pettersson, H. & Rodríguez-Martínez, H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 58:1065-1079.
- Fürst, R., Carvalho, G.R., Fürst, C.O.M., Ruas, J.R.M., Borges, A.M. & Mafilli, V. 2005. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(5):599-607.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63:431-444.
- Harrison, R.A.P. & Vickers, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88:343-352.
- Hancock, J.L. & Hovell, G.J.R. 1959. The collection of boar semen. *The Veterinary Record*, 71:664-665.
- Kashiwazaki, N., Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T. & Inomata, T. 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White rabbit spermatozoa. *The Journal of Reproduction and Development*, 52(4):511-516.
- Larsson, K. & Einarsson, S. 1976. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand*, 17(1):74-82.
- Ohata, P.M., Wentz, I., Bernardi, M.L., Castagna, C. & Bortolozzo, F.P. 2001. Viability of frozen swine semen submitted to a pre-freezing equilibrium time in the presence or absence of seminal plasma. *Arquivos da Faculdade de Veterinária*, 29(2):123-129.
- Ohata, P.M., Bernardi, M.L., Reis, G.R., Bortolozzo, F.P. & Wentz, I. 2005. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. *Archives of Veterinary Science*, 10(1):69-74.
- Parrila, I., Vazquez, J.M., Caballero, I., Gil, M.A., Hernandez, M., Roca, J., Lucas, X. & Martinez, E.A. 2009. Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs. *Society for Reproduction and Fertility Suppl.*, 66:37-50.
- Peláez, J., Breininger, E., Alegre, B., Peña, F.J. & Dominguez, J.C. 2006. In vitro Evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0,25 ml straws. *Reproduction Domestic Animal*, 41:153-161.
- Pereira, J.C.C. 2004. *Melhoramento genético aplicado à produção animal*, 4ªed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora.
- Pursel, V.G. & Park, S. 1985. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: International Conference on deep freezing of boar semen, 1, 1985, Uppsala. *Proceedings...* Uppsala, 147-166.
- Roca, J., Hernández, M., Carvajal, G., Vázquez, J.M. & Martínez, E.A. 2010. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, 84:2692-2699.
- SAEG. 2007. Sistema de análise estatística e genética – SAEG versão 9.1. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados, 68p.
- Sollero, B.P., Paiva, S.R., Faria, D.A., Guimarães, S.E.F., Castro, S.T.R., Egito, A.A., Albuquerque, M.S.M., Piovezan, U.,

Bertani, G.R. & Mariante, A.S. 2009. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livestock Science*, 123(1):8-15.

the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*, 47(2):109-124.

Thirumala, S., Ferrer, M.S., Eilts, B.E., Paccamonti, D.L. & Devireddy, R.V. 2003. Cryopreservation of canine spermatozoa theoretical prediction of optimal cooling rates in