

USO DO DMSO A 3% E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL NA CURVA DE RESFRIAMENTO DO SÊMEN SUÍNO

(Use of 3% DMSO and different glycerol concentrations in the swine semen cooling curve)

Ludymila Furtado CANTANHÊDE¹; Daianny Barboza GUIMARÃES¹;
Tatyane Bandeira BARROS¹; Aline Viana DIAS¹; Lina
Raquel Santos ARAÚJO¹; Ricardo TONIOLLI²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: 60.740-000; ²Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (UECE). *E-mail: lud_furtado@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo testar o crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO-3%) e o glicerol, em cinco concentrações (0,5%, 1%, 3%, 5% e 7%) em uma nova curva de resfriamento. Foram feitas sete coletas de sete varrões (n=49) através da técnica da mão enluvada. O DMSO (3%) e o glicerol foram adicionados separadamente ao diluente de congelação. Durante a análise da curva, a menor média de vigor espermático foi observada à concentração de 7% de glicerol. Na concentração de 1% de glicerol obteve-se maior média de motilidade espermática (72±12,3), sem diferença em relação à concentração de 5%. Maiores médias de vigor e motilidade espermática pós-descongelação foram observadas a 3% de glicerol, diferindo das concentrações de 0,5% de glicerol e 3% de DMSO quanto ao vigor e dos demais tratamentos quanto à motilidade espermática. No teste de resistência osmótica o glicerol a 3% como diluente de congelação proporcionou melhor proteção à membrana espermática, diferindo dos demais tratamentos, exceto do DMSO a 3% e glicerol a 1%. Observou-se maior porcentagem de células vivas na concentração de 5% e 7% de glicerol, diferindo das demais concentrações. Já o maior percentual de espermatozoides com acrossomas intactos foi observado quando se utilizou o diluente de congelação contendo glicerol a 3% (73,8±11,9). Os resultados do presente estudo, sugeriram que o glicerol, ainda é a melhor opção de crioprotetor a ser utilizada nos processos de criopreservação do espermatozoide suíno.

Palavras-chave: Agentes crioprotetores, congelação, espermatozoide, varrão.

ABSTRACT

This study aimed to test the cryoprotectant Dimethylsulfoxide (DMSO-3%) and glycerol, in five concentrations (0.5%, 1%, 3%, 5% and 7%) in a new cooling curve. Seven collections from seven boars (n=49) through the gloved hand technique were made. DMSO (3%) and glycerol were added separately to the freezing diluent. During the analysis of the curve, the lowest mean sperm count was observed at a concentration of 7% glycerol. The concentration of 1% glycerol obtained more sperm motility (72±12.3) but, did not differ in concentrations of 5% glycerol. Higher mean sperm motility and vigor after thawing were observed at 3% glycerol, differing from 0.5% glycerol and 3% DMSO concentrations regarding vigor and other treatments regarding sperm motility. In the osmotic resistance test, 3% glycerol as a freezing agent provided better protection to the spermatic membrane, differing from the

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

other treatments except for 3% DMSO and 1% glycerol. A higher percentage of living cells was observed in the 5% and 7% glycerol concentration, differing from the other concentrations. The highest percentage of spermatozoa with intact acrosomes was observed when the freezing diluent containing 3% glycerol (73.8 ± 11.9) was used. The results of this study suggested that glycerol is still the best cryoprotective option to be used in cryopreservation processes of swine sperm.

Key Words: Cryoprotector agents, freezing, sperm, boar.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um recurso que tem tornado a atividade reprodutiva mais competitiva. A criopreservação vem se destacando principalmente quando relacionada à conservação de sêmen e de embriões. Sua otimização possibilita a formação de bancos de germoplasma, aumento da produtividade de animais de elevado valor genético, preservação de espécies e raças ameaçadas de extinção e facilidade no transporte de espermatozoides. Para que seja possível uma boa conservação da célula espermática, é necessário preservar-se a integridade celular (BAKHACH, 2009). Adicionalmente, uma curva ideal de resfriamento e a diluição do sêmen em meios adequados são cuidados que não podem ser negligenciados (TONIOLLI e CANTANHÊDE, 2019; ANDRADE *et al.*, 2019).

Pesquisas abordando o envase do sêmen, diferentes diluentes, curvas de resfriamento, descongelação e a ação de crioprotetores, são os principais responsáveis pelos avanços nesta área (ATHURUPANA e FUNAHASHI, 2016; BARROS *et al.*, 2016). Quanto aos crioprotetores, eles protegem as células durante o abaixamento da temperatura, promovendo a estabilização das proteínas intracelulares, reduzindo a formação de cristais de gelo intracelulares e diminuindo o impacto dos eletrólitos no meio intra e extracelular (YESTE *et al.*, 2016). Diversos estudos têm sido feitos visando encontrar um crioprotetor ideal, tendo apresentado uma variação no tocante à concentração utilizada de acordo com a espécie animal (VARELA Jr *et al.*, 2012; MADEIRA *et al.*, 2013).

O glicerol foi a primeira substância utilizada e ainda é o mais empregado visando a proteção espermática. Porém, dependendo da sua concentração, pode interferir na capacidade fecundante dos espermatozoides, devido ao seu grau de toxicidade celular (PURDY, 2006). Apesar do espermatozoide suíno, ser mais sensível ao glicerol do que o bovino (FISER, 1991), ainda não foi identificado um outro crioprotetor que o substitua satisfatoriamente. Por outro lado, a ação crioprotetora do dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido evidenciada em trabalhos de criopreservação em diferentes espécies: de folículos ovarianos na mulher, na porca e na cadela (DEMEESTERE *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2016), oócitos de búfalas e ratas (MAHMOUND *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2009), embriões de búfala (KUMAR *et al.*, 2010) e espermatozoides suínos (ALKMIN *et al.*, 2016). Ele tem uma baixa toxicidade (STONE, 1993), boa capacidade citoprotetora (SOLOCINSKI *et al.*, 2017), apresentando sinergismo com glicerol na melhora da qualidade e fertilidade in vivo de espermatozoides criopreservados (SHAH *et al.*, 2016).

Apesar de todos os efeitos benéficos dos crioprotetores, sua toxicidade limita a concentração em que ele pode ser utilizado, limitando também a eficácia da ação

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

crioprotetora (YESTE *et al.*, 2016). A partir das principais problemáticas relacionadas com o processo de criopreservação de sêmen na espécie suína, este trabalho teve como objetivo testar diferentes concentrações de glicerol além do DMSO a 3%.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), segundo processo nº 12.236.467-8/2012, atendendo aos critérios solicitados. Visando a coleta, manipulação, análise e seleção dos ejaculados, foram utilizados varrões com idade variando entre 12 e 30 meses, em sistema rotineiro de coleta de sêmen. Antes de cada coleta, foi realizada uma higienização externa do prepúcio com sabão neutro e água tratada seguida de esgotamento prepucial por pressão manual no sentido caudo-cranial e secagem da região com papel toalha descartável.

Avaliação do Ejaculado *in natura*

Um total de sete reprodutores foram coletados uma vez por semana, durante 7 semanas (n=49), através da técnica da mão enluvada (HANCOCK e HOVELL, 1959), em recipiente com capacidade para 500 mL, coberto por um filtro e protegido por envoltório térmico. Após a coleta e identificação, o ejaculado foi levado ao laboratório para o seu processamento. A fração gelatinosa, retida pelo filtro, foi desprezada e o sêmen *in natura* avaliado quanto ao volume (mL), concentração ($\times 10^6$ sptz/mL), total de sptz ($\times 10^9$ sptz), vigor espermático (0 a 5) e motilidade espermática (0 a 100%). Para as análises de vigor e motilidade, uma amostra de 15 μ L do sêmen *in natura* foi colocada entre lâmina e lamínula para avaliação através da microscopia óptica em aumento de 200x. Estes exames serviram para a avaliação individual da qualidade do ejaculado de cada reprodutor, sendo aproveitado o ejaculado que apresentasse vigor $\geq 3,5$ e motilidade $\geq 85\%$.

Curva de Resfriamento e Congelação do Sêmen

Visando a congelação do sêmen, de cada ejaculado separou-se um total de $2,5 \times 10^9$ sptz, que em seguida foi incubado por 15 minutos a 30 °C e após este tempo diluído em *Beltsviles Tawing Solution* (BTS) a uma proporção de 3 volumes de diluente para 1 volume de sêmen. O ejaculado foi mantido a esta temperatura por mais 45 minutos. Em seguida transferiu-se o sêmen diluído para tubos de centrífuga (50 mL), mantidos em banho maria a 25 °C durante 30 minutos. Após este período os tubos foram transferidos para geladeira no escuro por 2 horas a 17 °C. Ao final deste tempo, centrifugou-se as amostras a 800g/15 minutos a 5 °C, desprezando o sobrenadante. Em seguida, a papa de espermatozoides (pellet - 0,5 mL) foi ressuspensa em 2,25 mL do diluente de refrigeração (5 °C) a uma concentração inicial de $909,1 \times 10^6$ sptz/mL. As amostras permaneceram a 5 °C por mais 60 minutos (resfriamento lento). Ao final desse tempo de incubação, gota a gota, adicionou-se ao tubo de centrífuga mais 2,25 mL do diluente de congelação, com uma concentração final de 500×10^6 células/mL. Em seguida o sêmen foi envasado em palhetas identificadas (0,5 mL), sendo as mesmas seladas com álcool polivinílico em pó (PVC) para congelação. A curva de

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

resfriamento teve como base o trabalho de Paquignon *et al.* (1974), tendo sido desenvolvida após testes de diferentes protocolos experimentais (Fig. 01).

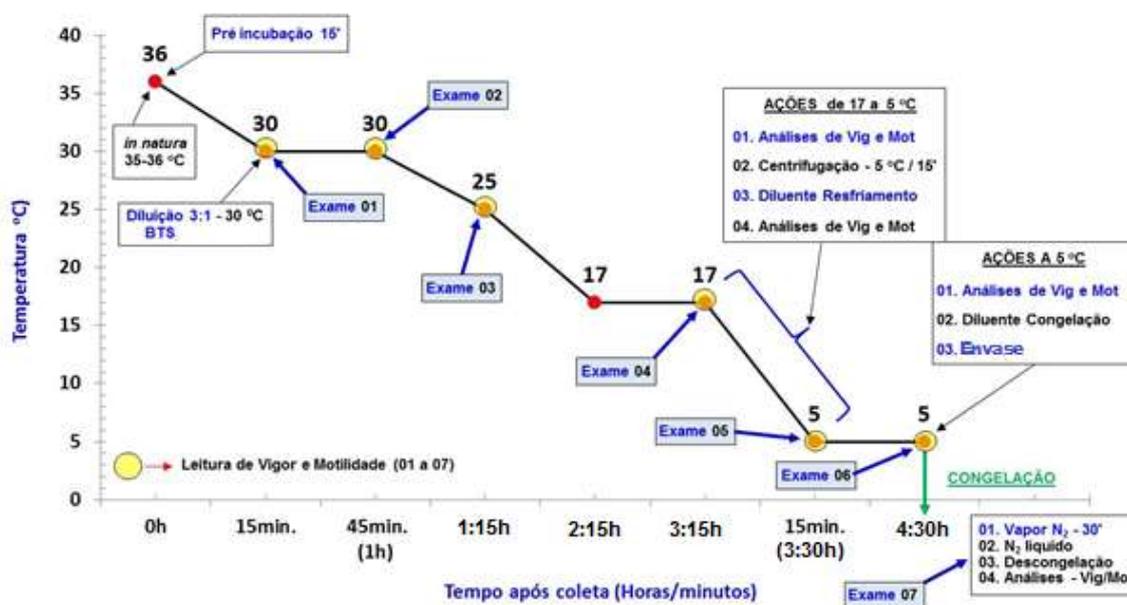


Figura 01: Pontos de análise de vigor e motilidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen.

Obs.: Diluentes: Resfriamento = 5,67g de frutose, 20% de gema de ovo e 100 mL de água destilada; Congelação a mesma composição + glicerol (nas concentrações de 1%, 2%, 6%, 10% e 14%) e dimetilsulfóxido (DMSO) a 6%. Uma vez que os dois diluentes foram adicionados volume:volume, assim a concentração final do glicerol e do DMSO fica a metade dos valores acima indicados.

As palhetas foram colocadas em uma rampa de congelação durante 30 minutos a 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido, a uma temperatura entre -60 a -70 °C, em seguida foram submersos em nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras foram assim conservadas por um tempo entre 48 e 96 horas, antes de serem descongeladas e analisadas.

Crioprotetores e tratamentos experimentais

Foram testados dois crioprotetores intracelulares, o glicerol e o DMSO, adicionados ao diluente de congelação no mesmo momento e maneira conforme descrito, dando origem a um total de seis tratamentos nas seguintes concentrações finais: 1) T1: glicerol a 0,5% (Gly0,5); 2) T2: glicerol a 1% (Gly1); 3) T3: glicerol a 3% (Gly3); 4) T4: glicerol a 5% (Gly5); 5) T5: glicerol a 7% (Gly7); 6) T6: dimetilsulfóxido a 3% (DMSO3). Os diferentes tratamentos foram comparados através das análises do vigor espermático (TONIOLLI, 1996); motilidade espermática, obtida pela observação do percentual de células com movimento (MARTIN RILLO *et al.*, 1996); funcionalidade de membrana ou resistência osmótica (REVELL e MRODE, 1994); vitalidade (% de células vivas) e integridade acrossomal (DERIVAUX, 1980).

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

MOMENTOS E ANÁLISES DO SÊMEN

Durante a curva de resfriamento

Foram feitas seis avaliações do vigor e da motilidade espermática em diferentes momentos (Fig. 01), conforme a seguir: 01 = logo após a diluição 3:1 com o diluente; 02 = após o período de incubação; 03 = após o período de descida da temperatura; 04 = após incubação e antes da centrifugação; 05 = após centrifugação e adição diluente resfriamento e 06 = após incubação e adição do diluente de congelação. Visando as análises, foi retirado da amostra seminal uma gota de 15µL, colocada entre lâmina e lamínula, aquecida a 37 °C por 10 min. e examinada à luz da microscopia óptica em um aumento de 200x.

Visto que os tratamentos com Glicerol e DMSO só poderiam ser comparados a partir da adição do diluente de congelação (exame 6), foi considerado para efeito de comparação os valores obtidos para as características vigor e motilidade espermática nos exames de 1 a 4 (média) (somente com o diluente BTS) e da mesma forma no exame 5 (com BTS e frutose). Foram então comparados os seguintes resultados: exames 1, exame 5 e Gly0,5; Gly1; Gly3; Gly5; Gly7 e DMSO 3% (exame 6).

Após a criopreservação

O sêmen foi submetido à descongelação rápida e posterior ressuspensão. Com esta finalidade, o conteúdo de cada palheta foi aquecido a uma temperatura de 37 °C, durante 50 segundos em banho-maria e em seguida adicionado o diluente de ressuspensão (BTS) na mesma temperatura. Visando os testes *in vitro*, esta ressuspensão respeitou a concentração de uma dose inseminante, sendo cada palheta (0,5 mL) adicionado de 2 mL do diluente de ressuspensão. Depois de descongeladas e ressuspensas, cada amostra foi colocada dentro dos tubos de ensaio, mantidas em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos para em seguida serem feitas as análises de vigor, motilidade, integridade acrossomal, vitalidade espermática e resistência osmótica. Todas as análises foram realizadas após descongelação, ressuspensão e incubação do sêmen em banho maria a 37 °C durante 10 minutos.

Integridade Acrossomal e Vitalidade Espermática

Foi feito um esfregaço de sêmen corado, contando-se um total de 200 células/esfregaço, através da microscopia óptica utilizando-se óleo de imersão e aumento de 1000x. A solução corante era formada por: azul de bromo-fenol = 0,1g; citrato de sódio = 0,4g; água destilada = 10mL. Foi medida a osmolaridade da solução e se necessário ajustada entre 300 e 310 mOsm. Para preparação do esfregaço, se adicionou uma gota de sêmen com outra de corante (15µL cada) e homogenizou-se. Após 30 segundos procedeu-se o esfregaço a partir dessa preparação o qual foi seco a temperatura ambiente para posterior análise. Antes de serem misturados, sêmen e corante estavam à mesma temperatura. Segundo a morfologia do acrossoma e vitalidade, os espermatozoides foram classificados em 2 categorias: 1) Total de células com acrossoma intacto (BORTOLOZZO *et al.*, 2005); 2) Total de células Vivas. (MEDEIROS *et al.*, 2006)

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

Teste de Resistência Osmótica

A técnica consistiu na adição de 1mL de sêmen diluído em 15mL de água destilada, mantidos por 15 minutos em banho-maria a 37 °C (solução A). Após o período de incubação, em 1mL da solução A foi adicionado 0,5mL de formol salino a 1% (solução B). Dessa nova solução (C) foi retirada uma alíquota de 15 μ L, colocado em uma lâmina, recoberto por uma lamínula e em seguida levado ao microscópio óptico com um aumento de 200x, sendo contado um total de 200 espermatozoides por amostra. Células com cauda reta é indicativo de ruptura de membrana, as que permanecerem com membrana íntegra apresentam cauda enrolada ou dobrada. Segundo alguns autores (BARIL *et al.*, 1993; GRAHAM e MOCÉ, 2005), um ejaculado que apresente um resultado mínimo 50% de espermatozoides reativos ao teste, pode ser considerado um sêmen de boa qualidade.

Análise Estatística

O presente trabalho foi conduzido sob um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo distribuído em blocos ao acaso. Todos os reprodutores foram coletados semanalmente, sendo os ejaculados distribuídos por todos os tratamentos. Todas as variáveis quantitativas foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição utilizando o teste de Shapiro-Wilk do aplicativo estatístico SAS (v.9.2, SAS Institute, NC, EUA – SAS, 1988). As variáveis paramétricas foram submetidas a análise de variância multifatorial utilizando-se o procedimento *General Linear Models* (GLM), do programa Statistical Analysis System (SAS 6.03) e as médias foram comparadas entre os grupos por meio dos testes de Tukey. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney e o Qui-quadrado para os resultados em porcentagem. Todos os testes foram realizados com um índice de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração espermática do sêmen *in natura*, dos 48 ejaculados analisados no experimento apresentaram aspecto normal, coloração branco leitosa, volume médio de 263,02 mL e concentração média de 356,74 $\times 10^9$ spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CORREA *et al.*, 2001; SMITAL, 2009). O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade de 90 \pm 3,9 e vigor de 4,0 \pm 0, estando apto a ser utilizado nos experimentos.

O maior valor do vigor espermático durante a curva de resfriamento foi observado após centrifugação e adição do diluente resfriamento à temperatura de 5 °C (exame 5) com média de 3,8 \pm 0,4, o qual diferiu dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Nas análises de 1 a 4 (contendo somente BTS), antes da centrifugação e adição do diluente de resfriamento, a média de vigor espermático foi a mais baixa durante a curva. Este resultado também foi visto no grupo experimental contendo a maior concentração de glicerol (Gly7), diferindo das demais análises, exceto do glicerol a 3% ($p < 0,05$). Comparando-se as diferentes concentrações do crioprotetor, depois da adição do diluente de congelamento (exame 6), estas não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) das demais concentrações (incluindo DMSO), com

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

exceção da concentração de 7% de glicerol (Tab. 01). Aparentemente a concentração de 7% do glicerol no meio conservante, apresentou uma ação tóxica sobre o espermatozoide, que se traduziu por uma diminuição significativa do valor do vigor espermático.

Tabela 01: Vigor (0 a 5) e motilidade espermática (%) do sêmen suíno em diferentes pontos durante a curva de resfriamento após adição de diferentes diluentes de congelamento.

Pontos da curva de resfriamento		Parâmetros	
		Vigor (0 a 5)	Motilidade (%)
Exame 1 a 4	BTS (3:1)	3,1±0,2 ^c	72±4,5 ^{bc}
Exame 5	Dil. Resfr.	3,8±0,4 ^a	76±8,6 ^a
Exame 6	DMSO (3%)	3,4±0,4 ^b	69±11,4 ^{bd}
	Gly0,5	3,4±0,4 ^b	69±13,9 ^{bd}
	Gly1	3,5±0,4 ^b	72±12,3 ^{ac}
	Gly3	3,3±0,5 ^{bc}	67±11,9 ^d
	Gly5	3,4±0,4 ^b	71±11,1 ^{bc}
	Gly7	3,1±0,2 ^c	67±12,3 ^{bd}

a, b, c, d: letras diferentes na mesma coluna, diferença significativa ($p < 0,05$).

Exames 1 a 4: média de vigor/motilidade espermática dos pontos 1, 2, 3 e 4 na curva de resfriamento, diluídos com BTS. **Exame 5:** média de vigor/motilidade espermática do ponto 5 na curva de refrigeração, após centrifugação e adição do diluente de resfriamento (gema de ovo, frutose). **Exame 6:** média de vigor/motilidade espermática do ponto 6 na curva de resfriamento, após adição do diluente de congelamento.

Na Tab. 01, pode-se também observar que o percentual de células móveis foi maior após centrifugação e adição do diluente de resfriamento (exame 5), não diferindo estatisticamente apenas do tratamento com adição de glicerol a 1%, que apresentou maior valor médio de motilidade espermática dentre as concentrações de crioprotetores. As menores porcentagens de células móveis foram observadas em espermatozoides criopreservados sob as concentrações de 3% e 7% de glicerol (ambas com 67%), não havendo diferença estatística entre elas ($p > 0,05$). Os resultados nos tratamentos com DMSO (3%) e glicerol (0,5%) mostraram-se semelhantes às médias mais baixas de motilidade espermática (glicerol a 3% e a 7%) e ao glicerol a 5%, não diferindo dos resultados das primeiras análises da curva (exame 1 - 4). Amostras de sêmen criopreservadas em diluente contendo 1% de glicerol apresentaram maiores médias de motilidade em relação às demais concentrações ($p < 0,05$), exceto a com glicerol a 5% e também foi o único que se igualou ao melhor resultado de motilidade, obtido no exame 5. Quando comparado DMSO e glicerol na mesma concentração (3%), não foram observadas diferenças entre as médias de células móveis ($p > 0,05$).

Como observado neste trabalho, a diminuição dos valores de vigor e motilidade espermática é um efeito esperado durante o processo de resfriamento e conservação seminal.

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

Mesmo em baixas temperaturas, a célula não se encontra totalmente em quiescência, havendo consumo e diminuição de nutrientes presentes no meio diluente. Como resultado ocorre o aumento de produtos tóxicos no meio devido ao metabolismo espermático ainda em atividade (CORREA *et al.*, 2001), há também alterações de pH e osmolaridade (WATSON, 1996).

Durante todas as análises na nova curva de resfriamento foram observados altos valores de vigor e porcentagem de células móveis em todos os tratamentos. Comparando os diferentes pontos de análise durante a curva de resfriamento, observou-se maiores médias para essas características durante o exame 5, após centrifugação e adição do diluente de refrigeração. Após o processo de centrifugação ocorre a retirada quase total do plasma seminal restando somente o pellet de espermatozoides. O plasma seminal possui componentes que estão relacionados com a fertilidade e funcionalidade do espermatozoide, porém sua ação pode ser benéfica ou deletéria (BERGERON e MANJUNATH, 2006). Seus componentes também podem influenciar negativamente a conservação de sêmen por conter fatores de decapacitação e inibidores de motilidade, além de diminuir a viabilidade espermática (MANJUNATH, 2012). Kawano *et al.* (2004) relataram a existência de fatores no plasma que modificam o espermatozoide e reduzem a capacidade de fertilização após a congelção de sêmen suíno. Estes melhores resultados no exame 5 da curva de resfriamento, também podem ser explicados pela adição do diluente de resfriamento com gema de ovo na sua composição, que é um crioprotetor extra-celular.

Com o objetivo de diminuir possíveis crioinjúrias durante o protocolo de congelção, algumas substâncias com ação crioprotetora, foram adicionadas aos diluentes. Apesar da grande utilidade do glicerol em protocolos de conservação de sêmen suíno como crioprotetor intracelular (BORTOLOZZO *et al.*, 2005), neste estudo, durante as análises da curva de resfriamento, não houve diferença estatística entre os resultados médios obtidos com o DMSO e com o glicerol, ambos a 3% adicionados ao diluente de congelção.

Como crioprotetor, o DMSO foi utilizado pela primeira vez na criopreservação de sêmen de touro e hemácias humanas e bovinas (LOVELOCK e BISHOP, 1959). Seu efeito crioprotetor pode ser explicado pelas próprias características desta substância que favorecem bons resultados para conservação. Dentre elas, a alta habilidade de permear a membrana da célula devido ao seu baixo peso molecular, propriedade que provavelmente permite a esses compostos ligarem-se às moléculas de água (KAROW, 2001; BALL e VO, 2001). Por ser um álcool dipolar, também é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas outras drogas sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas (SOJKA *et al.*, 1990). Além disso, tanto o DMSO quanto seus metabólitos possuem baixo potencial tóxico (GCC, 2007).

Após descongelção, percebeu-se que o aumento das concentrações do glicerol até a concentração de 5% no diluente de congelção foi acompanhado pelo aumento dos valores médios de vigor e de motilidade espermática (Tab. 02). Os melhores resultados de vigor espermático foram observados sob as concentrações de 1%, 3%, 5% e 7% de glicerol, apesar dos extremos (1 e 7%) não apresentarem diferença estatística em relação ao glicerol a 0,5% ($p > 0,05$). O diluente de congelção contendo DMSO a 3% resultou em menor valor médio de vigor espermático após a descongelção, diferindo de todos os outros tratamentos

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

($p < 0,05$). Amostras de sêmen na qual se utilizou o glicerol a 5% como crioprotetor apresentaram maior valor médio ($2,3 \pm 0,7$) de vigor espermático, apesar de não ter havido diferença significativa com outras concentrações do glicerol, com exceção da mais baixa (0,5%).

Tabela 02: Vigor e motilidade espermática do sêmen suíno em diferentes concentrações de glicerol e DMSO (3%), após descongelação e ressuspensão no diluente BTS.

Tratamentos (%)	Vigor (0 a 5)	Motilidade
DMSO3	$1,2 \pm 0,8^c$	$7 \pm 8,9^d$
Gly0,5	$1,7 \pm 1,0^b$	$13 \pm 12,9^c$
Gly1	$1,8 \pm 0,9^{ab}$	$15 \pm 13,6^{bc}$
Gly3	$2,0 \pm 0,4^a$	$38 \pm 12,1^a$
Gly5	$2,3 \pm 0,7^a$	$21 \pm 16,6^b$
Gly7	$2,0 \pm 0,7^{ab}$	$21 \pm 18,1^{bc}$

a,b,c,d: letras diferentes na mesma coluna, diferença significativa ($p < 0,05$).

Nos resultados da porcentagem de células móveis (Tab. 02), o DMSO a 3% também apresentou o menor valor médio para esta característica, diferindo dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Já o melhor resultado de motilidade espermática foi observado nas amostras em que se utilizou a concentração de 3% de glicerol no diluente de congelação, em relação à todos os outros tratamentos, incluindo do DMSO ($p < 0,05$).

Neste estudo observou-se que o uso do DMSO (3%) como crioprotetor de células espermáticas suínas apresentou resultados mais baixos de vigor e motilidade, corroborando com Kim *et al.* (2011), que demonstraram que o DMSO, mesmo em maior concentração (5%) não conseguiu manter uma boa qualidade espermática ao sêmen suíno em comparação ao glicerol 3%. Diversos autores (MORAES *et al.*, 1998) observaram que os resultados médios da motilidade inicial e final em tratamentos usando o glicerol, foram melhores do que os resultados com o uso do etilenoglicol, durante a criopreservação do sêmen de ovinos. Estudos feitos em outro trabalho (CARDOSO *et al.*, 2000), demonstraram a importância do uso do glicerol durante a criopreservação de sêmen em diluente alternativo a base de água de coco, bem como em outros diluentes (TONIOLLI *et al.*, 2014 e 2015) podendo ele ser considerado um crioprotetor de eleição para o sêmen suíno.

Observou-se que o diluente isoladamente não foi eficaz na preservação da qualidade espermática, e com a adição do glicerol ao meio, uma maior ação crioprotetora foi evidenciada, visto que, somente após o uso do glicerol, houve uma diferença significativa de vigor e motilidade espermática entre os diferentes tratamentos. Apesar dos bons resultados durante a curva de resfriamento com o uso do DMSO, este crioprotetor demonstrou não ser tão eficaz para manter bons resultados de vigor e motilidade durante a criopreservação do sêmen. Possivelmente outras concentrações do DMSO adicionado ao diluente de congelação devam ser testadas. Por outro lado, acredita-se que uma melhor combinação entre o tipo de crioprotetor e a técnica de congelação ainda precisa ser determinada (PENA *et al.*, 2003).

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

A Tab. 03 apresenta os resultados médios das análises da resistência osmótica (funcionalidade de membrana), nos quais as concentrações extremas de glicerol não protegeram a membrana plasmática de maneira tão eficiente quanto às intermediárias (1 e 3%). Os resultados de funcionalidade de membrana espermática nas concentrações de glicerol de 0,5%, 5% e 7%, não diferiram entre si ($p>0,05$), mas foram inferiores aos resultados obtidos com o tratamento Gly3 que apresentou melhor resultado ($p<0,05$), mas que apresentou uma equivalência de resultados ($p>0,05$) em relação às concentrações de 1% de glicerol e 3% do DMSO, sendo estes três tratamentos, os que obtiveram os melhores resultados de resistência osmótica. Apesar de não ter apresentado o maior valor para a característica resistência osmótica, o DMSO (3%), obteve um bom resultado que não diferiu estatisticamente da concentração de 3% de glicerol (maior média), porcentagem esta comumente utilizada na conservação de sêmen suíno (YANG *et al.*, 2016). A literatura relata que o glicerol em baixas concentrações (entre 1 e 3%) permite uma melhor qualidade pós descongelamento (ALMID e JOHNSON, 1988), sendo ele o crioprotetor de eleição para o sêmen do varrão (SILVA *et al.*, 2015; DAS *et al.*, 2016).

Tabela 03: Resistência osmótica do sêmen suíno em diferentes concentrações de glicerol e DMSO a 3% após descongelamento e ressuspensão no diluente BTS.

Tratamentos	Resistência Osmótica (%)
DMSO3	35,2±5,9 ^{abc}
Gly0,5%	33,6±4,8 ^{cd}
Gly1%	35,6±3,7 ^{ab}
Gly3%	36,9±4,7 ^a
Gly5%	33,0±4,2 ^d
Gly7%	32,7±4,1 ^d

a,b,c,d: letras diferentes na mesma coluna, diferença significativa ($p<0,05$).

Neste trabalho o DMSO preservou satisfatoriamente a funcionalidade da membrana espermática, e seu bom desempenho nos resultados de resistência osmótica após a criopreservação também pode ser explicado pela sua maior rapidez em penetrar na membrana plasmática e reduzir a possibilidade de dano celular, causado pelo estresse osmótico, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular e mantendo as características essenciais para o funcionamento do espermatozoide (BALL e VO, 2001). Considerando a sua baixa toxicidade juntamente com os resultados da característica resistência osmótica, o DMSO pode ser indicado para substituir o glicerol em protocolos de congelamento espermática.

Ao contrário dos demais parâmetros analisados neste estudo, obteve-se melhores percentuais de células vivas (Tab. 04) nas concentrações mais altas de glicerol (5% e 7%) e com diferenças significativas em relação aos demais tratamentos ($p<0,05$). Com a menor concentração de glicerol (0,5%) obteve-se 43,6±3,9 de células vivas, sendo a menor porcentagem entre todos os tratamentos. O processo de congelamento/descongelamento, causa

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

danos celulares levando os ejaculados a uma diminuição do número de células vivas pós descongelamento (SILVA e GUERRA, 2011).

Resultados de vitalidade espermática de sêmen criopreservado em diluente contendo DMSO não diferiram dos com glicerol na mesma concentração de 3%. O glicerol é um constituinte normal presente nas membranas celulares e em todos os óleos e gorduras animal e vegetal, podendo ser metabolizado por todas as células. As propriedades das membranas, têm uma importante função no que diz respeito à sua qualidade e integridade, que por sua vez tem influência direta sobre a sobrevivência da célula após criopreservação (WATSON, 2007). Desta forma o uso de um crioprotetor eficiente é fundamental para se ter um sêmen viável após o processo de criopreservação, uma vez que a viabilidade espermática é normalmente reduzida, devido a injúrias celulares provocadas durante todo o processo de congelamento/descongelamento (BIANCH *et al.*, 2006).

Tabela 04: Total de espermatozoides vivos (vitalidade) do sêmen suíno em diferentes concentrações de glicerol e DMSO a 3%, após descongelamento e ressuspensão no diluente BTS.

Tratamentos	Vitalidade (%)
DMSO3	49,2±4,9 ^c
Gly0,5%	43,6±3,9 ^d
Gly1%	54,7±3,8 ^b
Gly3%	49,5±9,9 ^c
Gly5%	58,1±6,7 ^a
Gly7%	56,8±5,6 ^a

a,b,c,d: letras diferentes na mesma coluna, diferença significativa ($p < 0,05$).

Dentre as diferentes espécies domésticas, o espermatozoide do varrão, é o mais sensível ao processo de congelamento, com o aparecimento de danos de membrana e de organelas celulares, devido ao estresse osmótico além de problemas como o choque térmico e formação de gelo intra-celular (WATSON, 2007). Desta forma, além da definição de um melhor crioprotetor, a melhor combinação entre ele e técnica de congelamento utilizada, ainda precisa ser encontrada (PENA *et al.*, 2003).

Com relação ao total de células com acrossomas intactos (Tab. 05), a concentração de 3% de glicerol no meio diluente de congelamento mostrou melhor resultado (75,0±3,8), diferindo das demais concentrações, inclusive do DMSO a 3% ($p < 0,05$) e o menor valor foi observado no tratamento com o glicerol a 7% (38,2±6,8).

A maior concentração de glicerol, provavelmente foi tóxica aos espermatozoides, quando analisada a morfologia acrossomal, diferindo de todos os tratamentos ($p < 0,05$). O DMSO a 3% obteve o segundo menor resultado de acrossoma intacto (51,4±7,5), não conseguindo superar a ação protetora do glicerol na mesma concentração ($p < 0,05$). Quando comparado com as demais concentrações de glicerol, o DMSO a 3% obteve resultado melhor apenas em relação ao glicerol a 7% ($p < 0,05$).

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

Tabela 05: Total de espermatozoides com acrossoma intacto do sêmen suíno em diferentes concentrações de glicerol e DMSO a 3% após descongelação e ressuspensão no diluente BTS.

Tratamentos	Acrossoma Intacto (%)
DMSO3	51,4±7,5 ^e
Gly0,5%	54,1±7,7 ^d
Gly1%	66,5±4,9 ^b
Gly3%	75,0±10,3 ^a
Gly5%	58,4±4,7 ^c
Gly7%	38,2±6,8 ^f

a,b,c,d: letras diferentes na mesma coluna, diferença significativa ($p < 0,05$).

O glicerol pode ser adicionado ao diluente, entretanto já foi relatado que sua toxicidade limita a sua concentração, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (YESTE *et al.*, 2016). Apesar de ser conhecido que substâncias crioprotetoras podem ter uma ação direta na produção de crioinjúrias em concentrações mais altas (YI *et al.*, 2001), através da alteração da polaridade do meio extracelular lesando as membranas, a origem dessas alterações ainda permanece incerta. Já foi relatado também a sua relação com alterações nos microtúbulos do citoesqueleto (PARKS e GRANHAM, 1992) e a indução acelerada da reação acrossomal (SLAVIK, 1987). Em geral são utilizadas baixas concentrações de glicerol na criopreservação de sêmen suíno devido aos seus efeitos tóxicos e prejudiciais às células espermáticas (BORTOLOZZO *et al.*, 2005; GARCIA-OLLIVARES *et al.*, 2016), estando inclusive, na espécie equina, relacionada com a queda da fertilidade do sêmen congelado (SQUIRES *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES

Durante a nova curva de resfriamento as médias de vigor e motilidade espermática observadas neste estudo foram satisfatórias em todos os tratamentos. Dessa forma, a curva pode ser utilizada em protocolos de criopreservação de sêmen suíno. Em todos os parâmetros após a descongelação, foram observados bons resultados na concentração de 3% de glicerol. Por sua vez, o DMSO a 3%, não demonstrou eficácia na preservação de vigor e motilidade, diferindo da média de glicerol a 3%. Este estudo demonstrou que a concentração de 3%, o DMSO não apresentou benefícios para a criopreservação de sêmen suíno em comparação ao glicerol. O glicerol ainda é a melhor opção de proteção da célula espermática suína em protocolos de criopreservação, necessitando-se de maiores estudos, a fim de se poder comprovar a viabilidade do uso do DMSO.

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

REFERÊNCIAS

- ALKMIN, D.V.; PARRILLA, I.; TARANTINI, T.; OLMO, D.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Seminal plasma affects sperm sex sorting in boars. *Reproduction, Fertility and Development*, v.28, p.556–564, 2016.
- ALMLID, T.; JOHNSON, L.A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol 172 addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science*, v.66, p.2899-2905, 1988.
- ANDRADE, A.F.C.; PEDROSA, A.C.; PASSARELLI, M.S.; MARTINS, S.M.M.K. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.89-96, 2019.
- ATHURUPANA, R.; FUNAHASHI, H. Milk supplements in a glycerol free trehalose freezing extender enhanced cryosurvival of boar spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. v.5, n.1, p.58-62, 2016.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v.22, p.1061-1069, 2001.
- BARIL, G.; CHEMINEAU, Y.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. 3^a ed., Nouzilly: INRA, 216., 1993. 137p.
- BARROS, T.B.; TONIOLLI, L.S.; GUIMARÃES, D.B.; FREITAS, E.N.; NUNES, T.G.P.; TONIOLLI, R. Curvas de resfriamento do sêmen do varrão diluído em ACP^{®103} adicionado de gema de ovo em concentração fixa. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.4, p.540-549, 2016.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproductive Development*, v.3, p.1338-1344, 2006.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MADEIRA, E.M.; MASCHIO, E.F.; CORRÊA, E.K.; JUNIOR, T.L.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Crioprotetores intra e extracelulares utilizados no congelamento do sêmen suíno. *Suinocultura Industrial*, v.09, p.32-36, 2006.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. *Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. 1^a ed., Porto Alegre: Brasil, 2005. 185p.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Congelamento do sêmen canino com um diluidor a base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. *Ciência Animal*, v.10, p.29-36, 2000.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, J.R.T.; DESCHAMPS, J.C. *Inseminação artificial em suínos*. 1^a ed., Copyright. Pelotas, Brasil, 2001. 194p.

*Endereço para correspondência:
lud_furtado@hotmail.com

DAS, A.K.; AHMED, N.; LALRINTLUANGA, K.; AHMED, F.A.; ALI, M.A.; SUBUDHI, P.K.; DEURI, D.; KURMI, D.J. Effect of Different Glycerol Levels on Quality of Frozen Semen of Mizo Local Boar. *Journal of Animal Research*, v.6, n.5, p.859-862, 2016.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; BUXANT, F.; ROBIN, V.; FERNADEZ, S.A.; CENTNER, J.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: Case Report. *Human Reproduction*, v.21, p.2010-2014, 2006.

DERIVAUX, J. *Reprodução dos Animais Domésticos*. Zaragoza: Editora Acribia, 1980. 446p.

FISER, P.S. Interaction of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals, Supplement*. v.1, p.1123-137, 1991.

GARCIA-OLIVARES, A.; GARZON-PEREZ, C.; GUTIERREZ-PEREZ, O.; MEDRANO, A. Effect of cooling to different sub-zero temperatures on boar sperm cryosurvival. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. v.5, n.1, p.63-66, 2016.

GAYLOR CHEMICAL COMPANY (GCC). Dimethyl sulfoxide (DMSO) health and safety information. *Slidell Bulletin*, n.106, 2007. 16p.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. v.64, p.492-504, 2005.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. *Veterinary Record*, v.71, p.664-665, 1959.

KAROW, A.M. For mammalian embryologists. Georgia, USA. *Cryobiology*, v.70, p.1-37, 2001.

KAWANO, N.; SHIMADA, M.; TERRADA, T. Motility and penetration competence of frozen thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*, v.61, p.351-364, 2004.

KIM, S.; LEE, Y.J.; JI, D.B.; KIM, Y.J. Evaluation of Different Cryoprotectants (CPAs) in Boar Semen Cryopreservation. *Theriogenology*, v.73, p.961-963, 2011.

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

LOPES, C.A.P.; ALVES, A.M.C.V.; JEWGENOW, K.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of canine ovarian cortex using DMSO or 1,3-propanediol. *Theriogenology*, v.86, n.5, p.1165-1174, 2016.

LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M.W.H. Preservation of freezing damage to living cells by dimethyl sulfhoxide. *Nature*, v.183, p.1394-1395, 1959.

MADEIRA, E.M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M.B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N.C.; PFEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.65, n.2, p.415-420, 2013.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. Animal Reproduction, v.09, p.809-815, 2012.

MAHMOUND, K.G.H.M.; SHOLKAMY, T.H.; AHMED, Y.F.; SEIDEL, G.E.; NAWITO, M.F. Effect of different combination of cryoprotectantes on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. Reproduction in Domestic Animals, v.45, p.565-571, 2010.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; De ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. Reproduction in Domestic Animals, v.31, p.519-526, 1996.

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEIRÊDO; RODRIGUES, L.F.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método de coloração vital para a avaliação do espermatozoide ovino. Revista Ciência Agrária, v.46, p.287-297, 2006.

MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol. Ciência Rural, v.28, n.2, p.287-292, 1998.

PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M.; DU MESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. Journées de Recherche Porcine en France, v.6, p.71-76, 1974.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, v.38, p.209-222, 1992.

PENA, J.F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. Theriogenology, v.60, n.4, p.677-689, 2003.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, v.63, p.215-225, 2006.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, v.36, p.77-86, 1994.

SAS Statistical Analysis System. v.6.03 Cary: SAS Institute, 1988. 1028p.

SHAH, S.A.H.; ANDRABI, S.M.H.; AHMED, H.; QURESHI, I.Z. Cryoprotection synergism between glycerol and dimethyl sulfoxide improves the mitochondrial transmembrane potential, plasmalemma, acrosomal and DNA integrities, and in vivo fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. Cytotechnology, v.68, p.2335-2344, 2016.

SILVA, A.R.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para a redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

SILVA, C.G.; CUNHA, E.R.; BLUME, G.R.; MALAQUIAS, J.V.; BÁO, S.N.; MARTINS, C.F. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, v.70, n.2, p.90-94, 2015.

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

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.110, p.335-346, 2009.

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

SOLOCINSKI, J.; OSGOOD, Q.; WANG, M.; CONNOLLY, A.; MENZE, M.A.; CHAKRABORTY, N. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, v.75, p.134-143, 2017.

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

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

TAN, X.; SONG, E.; LIU, X.; YOU, W.; WAN, F. Factors affecting the survival, fertilization, and embryonic development of mouse oocytes after vitrification using glass capillaries. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v.45, p.420-429, 2009.

TONIOLLI, R. Pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation. 1996. 91p. (These de Doctorat.) - Université François Rabelais de Tours, France, 1996. Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=182303>. Acesso em: 01/2012.

TONIOLLI, R.; CANTANHÊDE, L.F. Aspectos gerais da criopreservação de sêmen suíno. *Ciência Animal*, v.29, n.1, p.45-62, 2019.

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

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

VARELA Jr, A.S.; CORCINI, C.D.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIZZOTO, G.; JARDIM, R.D.; LUCIA JUNIOR, T.; FIGUEIREDO, M.R.C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Atlântica*, v.34, n.2, p. 119-135, 2012.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.135-140, 1996.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2007.

YANG, C.H.; WU, T.W.; CHENG, F.P.; WANG, J.H.; WU, J.T. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reproductive Biology*, v.16, n.1, p.41-46, 2016.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v.85, n.1, p.47-64, 2016.

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