



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**EFEITO DOS DILUENTES PIGPEL-5 E PIGPEL-5 PLUS SOBRE A QUALIDADE  
DO SÊMEN SUÍNO ACONDICIONADO À 5°C E 17°C**

FLAVIO JULIANO

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Pelotas, sob a orientação do  
Profº. Marcio Nunes Corrêa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação  
em Veterinária, Área de  
Concentração: Reprodução  
Animal, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Agosto de 2005



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**EFEITO DOS DILUENTES PIGPEL-5 E PIGPEL-5 PLUS SOBRE A QUALIDADE  
DO SÊMEN SUÍNO ACONDICIONADO À 5°C E 17°C**

FLAVIO JULIANO

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Pelotas, sob a orientação do  
Profº Marcio Nunes Corrêa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação  
em Veterinária, Área de  
Concentração: Reprodução  
Animal, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Agosto de 2005

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

J943e      Juliano, Flavio

Efeito dos diluentes pigpel-5 e pigpel-5 plus sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado à 5°C e 17°C / Flavio Juliano ; orientador Marcio Nunes Corrêa. – Pelotas, 2005. – 32f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Veterinária. Área de Concentração: Reprodução animal. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Suínos. 2.Sêmen suíno. 3.Lipoproteína de baixa densidade.  
4.Temperatura. 5.Diluyente pigpel-5. 6.Diluyente pigpel-5 plus. I.Corrêa, Marcio Nunes. II.Título.

CDD: 636.408245

FLAVIO JULIANO

**EFEITO DOS DILUENTES PIGPEL-5 E PIGPEL-5 PLUS SOBRE A QUALIDADE  
DO SÊMEN SUÍNO ACONDICIONADO À 5°C E 17°C**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Pelotas, sob a orientação do  
Profº Marcio Nunes Corrêa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação  
em Veterinária, Área de  
Concentração: Reprodução  
Animal, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

**APROVADA:**

---

**Profº João Carlos Deschamps**

---

**Profº Thomaz Lucia Jr**

---

**Profa. Sandra Mara da Encarnação Fiala**

---

**Profº Marcio Nunes Corrêa**

**(Orientador)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus ! Que na sua infinita providência, proporcionou meios e pessoas que contribuíram de forma esplêndida para a conclusão deste trabalho.

Ao meu grande amigo e orientador desta obra, Marcio Nunes Corrêa, que de forma incansável e fraterna contribuiu de todas as formas imagináveis para a realização deste feito.

Ao colega e grande amigo Ivan Bianchi, ao qual somente palavras seriam insuficientes para agradecer.

Aos co-orientadores Prof. Thomaz Lucia Junior e Prof. João Carlos Deschamps, pela presença e exemplo de estímulo à pesquisa e ao ensino.

À todos os integrantes do grupo PIGPEL e estagiários do Laboratório de Reprodução Animal, pela ajuda, carinho e exemplo de vivacidade. Especialmente aos que contribuíram de alguma forma e em algum momento para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AGRADECIMENTOS.....                                                                                                                                | IV        |
| ÍNDICE .....                                                                                                                                       | V         |
| SUMÁRIO.....                                                                                                                                       | VI        |
| SUMMARY .....                                                                                                                                      | VIII      |
| INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                                                             | 10        |
| <b>EFEITO DOS DILUENTES PIGPEL-5 E PIGPEL-5 PLUS SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO ACONDICIONADO À 5°C E 17°C.... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b> |           |
| RESUMO .....                                                                                                                                       | 12        |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                     | 13        |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                   | 13        |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                           | 16        |
| <i>Animais</i> .....                                                                                                                               | 16        |
| <i>Coleta dos ejaculados</i> .....                                                                                                                 | 16        |
| <i>Experimento 1</i> .....                                                                                                                         | 17        |
| <i>Experimento 2</i> .....                                                                                                                         | 17        |
| <i>Avaliação dos diluentes e dos ejaculados</i> .....                                                                                              | 18        |
| Osmolalidade e pH .....                                                                                                                            | 18        |
| Motilidade e Vigor .....                                                                                                                           | 18        |
| Morfologia Espermática .....                                                                                                                       | 19        |
| Teste do Choque Hiposmótico.....                                                                                                                   | 19        |
| Controle de Temperatura .....                                                                                                                      | 20        |
| <i>Análise estatística</i> .....                                                                                                                   | 20        |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                       | 21        |
| <i>Experimento 1</i> .....                                                                                                                         | 21        |
| <i>Experimento 2</i> .....                                                                                                                         | 24        |
| CONCLUSÕES .....                                                                                                                                   | 27        |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                         | <b>28</b> |

## SUMÁRIO

JULIANO, FLAVIO, Universidade Federal de Pelotas, agosto de 2005. **Efeito dos diluentes pigpel-5 e pigpel-5 plus sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado à 5°C e 17°C.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal). Faculdade de Veterinária. Orientador: Marcio Nunes Corrêa.

A utilização de caixas acondicionadoras com termostato regulável faz-se necessária, quando se utilizam diluentes capazes de manter a qualidade das doses inseminantes entre 15 e 18°C. Porém, é importante considerar que estas caixas apresentam um custo elevado e quando submetidas a grandes variações de temperatura ambiente, apresentam dificuldade em manter estável a temperatura interna na amplitude desejada. Além disso, a temperatura de estocagem do sêmen suíno entre 15 e 18°C limita seu transporte, restringindo seu tempo de vida útil e permitindo o crescimento bacteriano. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do sêmen suíno acondicionado no diluente PIGPEL-5, em que se utilizou gema de ovo como crioprotetor e no diluente PIGPEL5 *Plus*, com lipoproteína de baixa densidade (LDL), extraída da gema do ovo, como crioprotetor. No experimento 1, as doses inseminantes foram armazenadas utilizando-se caixas acondicionadoras à 5°C e 17°C, comparando-se os resultados entre os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus*, e dos mesmos em relação ao diluente BTS, acondicionado à 17°C, com o objetivo de comprovar a versatilidade dos diluentes em diferentes temperaturas de armazenamento. Os mesmos diluentes foram testados, no experimento 2, utilizando-se geladeira comercial e caixa acondicionadora de sêmen, ambas à 5°C, objetivando comprovar a eficácia dos diluentes testados quando acondicionados em geladeiras sem controle rígido de temperatura. Em ambos experimentos foram realizados testes de motilidade, morfologia espermática e integridade funcional da membrana através do choque hiposmótico. No experimento 1, o diluente PIGPEL-5 manteve a motilidade espermática, à 5°C e à 17°C, especialmente até 48 h de acondicionamento, não ocorrendo benefício com a adição de LDL. Quanto ao choque hiposmótico, o diluente PIGPEL5 *Plus* à 17°C foi superior ( $P<0,05$ ) nas 48h aos diluentes à 5°C, e nas 72h foi superior ( $P<0,05$ ) ao PIGPEL-5 à 17°C e BTS. O percentual de espermatozóides com morfologia normal não diferiu

( $P > 0,05$ ) entre os diferentes diluentes, a partir das 0h de acondicionamento. Quanto ao uso de geladeira comercial (experimento 2), os resultados não diferiram entre os diluentes testados ( $P > 0,05$ ). Ficou demonstrada a eficácia do diluente PIGPEL-5 quando acondicionado à 5°C e à 17°C, com gema de ovo ou na substituição desta por LDL (PIGPEL5 *Plus*), mantendo a qualidade espermática nos testes de motilidade, morfologia espermática e integridade funcional da membrana. Ficou demonstrado ainda a possibilidade do seu uso, tanto em caixa acondicionadora quanto em geladeira comercial.

**Palavras - chaves:** sêmen suíno, lipoproteína de baixa densidade, temperatura



## SUMMARY

JULIANO, FLAVIO, Universidade Federal de Pelotas, agosto de 2005. **Effect of diluents pigpel-5 and pigpel-5 plus under the quality of swine semen packaged at 5°C and 17°C.** Advisor: Marcio Nunes Corrêa.

The use of freezing packages with adjustable thermostat is necessary when we use diluents that are able to keep the quality of the inseminating doses between 15°C and 18°C. However, it is important to consider that these packages are expensive and when submitted to great variation of ambient temperature they present difficulty to keep the internal temperature in the desired amplitude. Besides this, the swine semen storage between 15°C and 18°C limits its transportation, constraining its useful lifetime and allowing bacterial growth. The goal of this study was to evaluate the quality of swine semen preserved in diluent PIGPEL-5, in which we added egg yolk as cryoprotectant and also to evaluate the quality of PIGPEL5 *Plus*, in which we added low density lipoprotein (LDL), extracted from egg yolk as cryoprotectant. In experiment 1 the inseminating doses were stored using freezing packages at 5°C and 17°C, to compare the results between diluents PIGPEL-5 and PIGPEL5 *Plus*, and these results related to extensor BTS, packaged at 17°C in order to prove the versatility of the diluent in different storage temperatures. The same diluents were tested in experiment 2, using commercial fridge and semen freezing package, both at 5°C, in order to prove the efficacy of the tested diluents when they are kept in fridges without severe control of temperature. In both experiments motility tests, sperm morphology and functional integrity of membrane through hypoosmotic shock were accomplished. In experiment 1, diluent PIGPEL-5 kept its sperm motility at 5°C and at 17°C, especially until 48h of packaging, not showing any benefit when LDL was added. As for hypoosmotic shock, the diluent PIGPEL5 *Plus* at 17°C was superior ( $P<0,05$ ) in the 48h than PIGPEL-5 at 17°C and BTS. The percentage of sperms with normal morphology did not differ ( $P>0,05$ ) between the different diluents as from 0h of packaging. As for the use of commercial fridge (experiment 2), the results did not differ between the tested diluents ( $P>0,05$ ). The effectiveness of PIGPEL-5 when packaged at 5°C and 17°C with egg yolk (PIGPEL5 *Plus*) keeping the sperm quality in the motility tests, sperm morphology

and functional integrity of the membrane was demonstrated. The possibility of its use both in freezing package and in commercial fridge was also demonstrated.

**Key words:** swine semen, low density lipoprotein, temperature

## INTRODUÇÃO GERAL

A carne suína representa aproximadamente 40% do total de carnes consumidas no mundo (ROPPIA, 2004), constituindo-se em uma importante fonte alimentar na dieta do homem. De 1993 a 2003, a produção de carne suína no mundo aumentou de 73 para 94 milhões de toneladas por ano, de acordo com GERRITS et al. (2005). Além disso, é projetado que a demanda de carne suína irá aumentar para 125 milhões de toneladas anuais até 2020 (DELGADO et al., 1999). Esse aumento de produção deve ocorrer especialmente nos países em desenvolvimento. O Brasil possui o 4º maior rebanho mundial de matrizes suínas (3,025 milhões de fêmeas), cuja produção destaca o Brasil como o 5º maior produtor mundial de carne suína, atingindo 2,69 milhões de toneladas em 2003, que corresponde a 3% do mercado mundial (ROPPIA, 2004). Neste contexto, a cadeia produtiva da suinocultura constitui um importante segmento do agronegócio brasileiro.

O aumento da eficiência de produção na suinocultura observado nos últimos anos é resultado da implementação de novas biotécnicas e práticas de produção, principalmente nas áreas de reprodução, nutrição, sanidade e ambiência. Dentre estas biotécnicas, a inseminação artificial (IA) tem se desenvolvido muito, devido especialmente ao fato de permitir a difusão de sêmen de animais geneticamente superiores para um número muito maior de fêmeas quando comparada à monta natural.

A grande maioria das IA em suínos realizadas no mundo utiliza sêmen diluído e acondicionado a temperaturas entre 15 e 18°C, por um período de 1 a 5 dias, sendo 85% realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte (JOHNSON et al., 2000). O diluente de sêmen suíno mais utilizado é o *Beltsville Thawing Solution* (BTS), desenvolvido por PURSEL & JOHNSON (1975), que inicialmente foi utilizado para congelamento de sêmen e posteriormente adaptado para o acondicionamento do sêmen entre 15 e 18°C, por três dias. Alguns diluentes têm sido desenvolvidos a fim de possibilitar um aumento no tempo de estocagem de 3 para 5 a 7 dias (LEVIS, 2000), ou mesmo possibilitar o armazenamento do sêmen a 5°C (CORRÊA, 2002).

1       Entretanto, quando se utilizam diluentes capazes de manter a qualidade das  
2 doses inseminantes entre 15°C e 18°C, se faz necessário a utilização de caixas  
3 acondicionadoras com termostato regulado para este intervalo de temperatura.  
4 Porém, é importante considerar que estas caixas apresentam um custo elevado,  
5 principalmente para pequenas unidades de produção de suínos e quando  
6 submetidas a variações de temperatura ambiente, apresentam dificuldade em  
7 estabilizar a temperatura interna na amplitude desejada. Além disso, a  
8 temperatura de estocagem entre 15 e 18°C limita o transporte do sêmen, pois  
9 além de exigir caixas térmicas específicas, restringe o tempo de vida útil do  
10 sêmen, já que não impede a atividade metabólica da célula, nem o crescimento  
11 bacteriano.

12       Com isso, uma alternativa seria utilizar diluentes que possibilitem o  
13 acondicionamento de sêmen suíno em refrigeradores domésticos com  
14 temperatura média de 5°C, o que permitiria uma maior disseminação da  
15 inseminação artificial, pela possibilidade da utilização da técnica por todos os  
16 sistemas de produção, mesmo em unidades com menor disponibilidade de  
17 recursos financeiros. Sendo assim, unidades de produção de qualquer porte  
18 poderiam desfrutar dos benefícios da inseminação artificial.

19       O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do diluente PIGPEL-5  
20 (CORRÊA, 2002) quando utilizado para acondicionar sêmen suíno tanto à 5°C  
21 quanto à 17°C, objetivando comprovar a versatilidade do diluente em diferentes  
22 temperaturas de acondicionamento; testar o desempenho do sêmen diluído com o  
23 PIGPEL-5 e armazenado em geladeiras domésticas, comparando ao  
24 desempenho do sêmen preservado em geladeiras com temperatura controlada,  
25 objetivando comprovar a eficácia do diluente quando acondicionado sem controle  
26 rígido de temperatura; agregar à fórmula do diluente PIGPEL-5 lipoproteínas de  
27 baixa densidade (PIGPEL5 *Plus*), visando maximizar o desempenho do diluente  
28 quanto à manutenção da qualidade espermática após acondicionamento.

29

30

31

32

33

**EFEITO DOS DILUENTES PIGPEL-5 E PIGPEL-5 PLUS SOBRE A  
QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO ACONDICIONADO À 5°C E 17°C**

**EFFECT OF DILUENTS PIGPEL-5 AND PIGPEL5 PLUS UNDER THE QUALITY  
OF SWINE SEMEN PACKAGED AT 5°C AND 17°C**

**Flavio Juliano, Ivan Bianchi, Carolina Gonçalves Serret, Thomaz Lucia Jr.,  
João Carlos Deschamps, Marcio Nunes Corrêa**

Laboratório de Reprodução Animal - Centro de Biotecnologia,  
Faculdade de Veterinária  
Campus Universitário s/nº – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS

---

***RESUMO***

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do sêmen suíno preservado no diluente PIGPEL-5, no qual se utiliza gema de ovo como crioprotetor externo de membrana espermática, e no diluente PIGPEL5 *Plus*, com lipoproteína de baixa densidade (LDL) como crioprotetor. No experimento 1, as doses inseminantes foram armazenadas utilizando-se caixas acondicionadoras à 5°C e 17°C, comparando-se os resultados entre os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus*, e dos mesmos em relação ao diluente BTS, acondicionado à 17°C, com o objetivo de comprovar a versatilidade dos diluentes em diferentes temperaturas de armazenamento. Os mesmos diluentes foram testados, no experimento 2, utilizando-se geladeira comercial e caixa acondicionadora de sêmen, ambas à 5°C, objetivando comprovar a eficácia dos diluentes testados quando acondicionados em geladeiras sem controle rígido de temperatura. Em ambos experimentos foram realizados testes de motilidade, morfologia espermática e integridade funcional da membrana através do choque hiposmótico. No experimento 1, o diluente PIGPEL-5 manteve a motilidade espermática, à 5°C e à 17°C, especialmente até 48 h de acondicionamento, não ocorrendo benefício com a adição de LDL. Quanto ao choque hiposmótico, o diluente PIGPEL5 *Plus* à 17°C foi superior ( $P<0,05$ ) nas 48h aos diluentes à 5°C, e nas 72h foi superior ( $P<0,05$ )

ao PIGPEL-5 à 17°C e BTSO percentual de espermatozóides com morfologia normal não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os diferentes diluentes, a partir da 0h de acondicionamento. Quanto ao uso de geladeira comercial (experimento 2), os resultados não diferiram entre os diluentes testados ( $P>0,05$ ). Ficou demonstrada a eficácia do diluente PIGPEL-5 quando acondicionado à 5°C e à 17°C, com gema de ovo ou na substituição desta por LDL (PIGPEL5 *Plus*), mantendo a qualidade espermática nos testes de motilidade, morfologia espermática e integridade funcional da membrana. Ficou demonstrada a possibilidade do seu uso, tanto em caixa acondicionadora quanto em geladeira comercial.

**Palavras - chaves:** sêmen suíno, lipoproteína de baixa densidade, temperatura

### **ABSTRACT**

The present study was designed to evaluate the quality of the swine semen preserved in diluent PIGPEL-5 in which egg yolk is added as external cryoprotectant of the sperm membrane and also to asses the quality of diluent PIGPEL5 *Plus* where low density lipoprotein (LDL) was added as cryoprotectant. In experiment 1, the inseminating doses were stored using freezing packages at 5°C and 17°C comparing the results between PIGPEL-5 and PIGPEL-5 *Plus*, and these two related to diluent BTS, stored at 17°C in order to prove the versatility of the diluents in different storage temperatures. The same diluents were tested, in experiment 2 using commercial fridge and freezing packages, both at 5°C, to prove the efficacy of the tested diluents when stored in fridges without severe control of temperature. In both experiments tests of motility, sperm morphology and functional integrity of membrane through hypoosmotic shock were accomplished. The percentage of sperm with normal morphology did not differ ( $P>0,05$ ) between the different diluents, time 0h of freezing. As for the use of commercial fridge (experiment 2) the results did not differ between the tested diluents ( $P>0,05$ ). The efficiency of diluent PIGPEL-5 when stored at 5°C and 17°C with egg yolk or substituted by LDL (PIGPEL plus) was proved , keeping the sperm quality in motility tests, sperm morphology and functional integrity of the membrane. The possibility of using both freezing package and fridge was also demonstrated

**Key words:** swine semen, low density lipoprotein, temperature

## INTRODUÇÃO

O processo de preservação do sêmen pelo frio acarreta diversas alterações em componentes essenciais das células espermáticas (acrossoma, núcleo, mitocôndria e membrana plasmática), reduzindo assim a qualidade do ejaculado, quando comparado ao sêmen fresco (AMIRAT et al., 2004; WATSON, 2000). Conseqüentemente, protocolos de resfriamento e congelamento, com a utilização de diluentes, visam prevenir lesões na membrana celular e a formação de gelo intracelular.

Durante o processamento, o choque térmico é um dos principais fatores que podem inviabilizar o sêmen, causando alterações na estrutura e funcionalidade da membrana plasmática (CONACANNON & BATISTA, 1989), o que pode levar a prejuízos na motilidade e morfologia espermáticas (HOLT, 2000).

O espermatozóide suíno é muito susceptível ao choque térmico (POLGE, 1956), que ocorre quando o ejaculado fresco é rapidamente resfriado, principalmente em temperaturas abaixo de 15°C, o que resulta em perda da viabilidade de um número elevado de espermatozóides (JOHNSON et al., 2000). A resposta de uma membrana celular à baixa temperatura está fortemente relacionada com a composição da membrana da célula. Por exemplo, as diferenças nas alterações estruturais induzidas pelo frio, entre o espermatozóide do touro (resistente ao frio) e do macho suíno (sensível ao frio), podem ser explicadas pelas diferenças na composição das suas membranas espermáticas. Os principais componentes da membrana, que determinam o comportamento das fases, são os ácidos graxos integrantes dos fosfolipídios. A membrana celular dos espermatozóides é caracterizada pela presença de ácidos graxos de cadeia longa polinsaturados. Estes ácidos graxos correspondem a aproximadamente 65% dos ácidos graxos do espermatozóide da espécie suína. Já em espécies mais resistentes, como bovinos, observa-se uma maior proporção de ácidos graxos saturados, com uma relação entre ácidos graxos saturados e insaturados mais uniforme (POULOS et al., 1973).

Outra importante diferença entre o touro e o macho suíno está no tipo de fosfolipídios que compoem a membrana, pois a baixa porcentagem de fosfatidilcolina (lecitina) e a alta porcentagem de fosfatidiletanolamina e esfingomielina no macho suíno, provoca uma dificuldade da membrana do

1 espermatozóide suíno em adquirir estabilidade. Outro fator que influencia o  
2 comportamento termotrófico das membranas é a porcentagem de colesterol. A  
3 relação colesterol/fosfolípido em espermatozoides suínos é muito baixa e o  
4 colesterol é distribuído assimetricamente, sendo encontrado em maior quantidade  
5 no lado externo do que na monocamada interior da membrana. Esta combinação  
6 de características estruturais torna a monocamada interna especialmente  
7 vulnerável ao choque térmico (JOHNSON et al., 2000). Alterações na sequência  
8 ou natureza química dos lipídios podem interferir negativamente nos processos  
9 ligados à fertilização. Assim sendo, a diminuição da capacidade fertilizante após a  
10 exposição ao frio pode estar relacionada a danos em lipídios específicos da  
11 membrana (BUHR et al., 2000).

12 Neste contexto, as lipoproteínas de baixa densidade podem atuar aumentando  
13 a resistência contra o choque térmico, permitindo uma maior qualidade  
14 espermática de ejaculados submetidos ao acondicionamento a baixas  
15 temperaturas. Estas lipoproteínas são moléculas esféricas de 17-60 nm de  
16 diâmetro, extraídas da fração solúvel da gema do ovo (DEMANIOWICZ et al.,  
17 1996).

18 A gema de ovo é um dos crioprotetores externos (ENGLAND, 1993) mais  
19 utilizados em diluentes de sêmen, em razão da presença da lipoproteína de baixa  
20 densidade (LDL), a qual associa-se à membrana plasmática protegendo o  
21 espermatozóide do choque térmico (BERGERON et al., 2004; WATSON, 1981).  
22 FOULKES (1977) e GRAHAM & FOOT (1987) sugeriram que a LDL pode aderir à  
23 membrana celular durante o processo de preservação espermática. Segundo  
24 ANTON et al. (2003), a LDL forma uma película interfacial entre os ácidos graxos  
25 da membrana e a água. Além disto, BERGERON et al. (2004) comprovaram que  
26 a LDL promove a entrada de fosfolípidios e colesterol para a membrana dos  
27 espermatozoides e também previne a saída de fosfolípidios e colesterol da  
28 mesma, formando um complexo com as proteínas do plasma seminal de modo  
29 que estas não fiquem disponíveis para atuarem na membrana. A prevenção do  
30 efluxo de fosfolípidios e colesterol confere à célula espermática maior resistência  
31 ao choque térmico. Entretanto, a gema de ovo utilizada na composição de  
32 diversos diluentes contém outras substâncias que dificultam a respiração celular  
33 (TOSIC & WALTON, 1946) e diminuem a motilidade espermática (PACE &



1 GRAHAM, 1974), além de poder ser um risco de contaminação por  
2 microorganismos (BOSSEAU et al., 1998).

3 O objetivo deste estudo foi testar o desempenho do sêmen diluído com o  
4 diluente PIGPEL-5 (CORRÊA, 2002) e armazenado em geladeiras domésticas,  
5 comparando ao desempenho do sêmen preservado em caixas acondicionadoras  
6 com temperatura controlada, objetivando comprovar a eficácia do diluente quando  
7 acondicionado sem controle rígido de temperatura, bem como avaliar o  
8 desempenho do diluente PIGPEL-5 quando utilizado para acondicionar sêmen  
9 suíno tanto à 5°C quanto à 17°C, objetivando comprovar a versatilidade do  
10 diluente em diferentes temperaturas de acondicionamento. A substituição da  
11 gema de ovo por LDL como crioprotetor do diluente (PIGPEL5 *Plus*) também foi  
12 testada, visando maximizar o desempenho do diluente quanto à manutenção da  
13 qualidade espermática após acondicionamento.

14

## 15 **MATERIAL E MÉTODOS**

### 16 **Animais**

17 O presente estudo foi conduzido com a utilização de ejaculados provenientes  
18 de 3 machos suínos F1 (Landrace x Large White) com fertilidade conhecida e  
19 aproximadamente 12 meses de idade e locados na Fazenda da Palma, da  
20 Universidade Federal de Pelotas-RS (Brasil). Os machos foram alojados e  
21 manejados em iguais condições zootécnicas quanto a espaço de alojamento e  
22 temperatura ambiente. O arraçamento foi feito de acordo com a condição  
23 corporal dos animais, duas vezes ao dia com dieta elaborada segundo  
24 recomendações nutricionais constantes no NRC (1998).

### 25 **Coleta dos ejaculados**

26 Os ejaculados foram coletados semanalmente, após criteriosa higienização da  
27 região prepucial dos machos, utilizando-se o método da mão-enluvada, seguindo  
28 recomendações de BEARDEN & FUQUAY (1997).

29

30

1 O trabalho constou de dois experimentos, Experimento 1 e Experimento 2:

## 2 **Experimento 1**

3 Foram utilizados quatro ejaculados de cada um dos três machos. Após a  
4 coleta e avaliação inicial, o ejaculado de cada macho foi diluído em condições  
5 isotérmicas em cada um dos três diluentes: BTS (PURSEL & JOHNSON, 1975),  
6 PIGPEL-5 (CORRÊA, 2002) e PIGPEL-5 adicionado de LDL (PIGPEL5 *Plus*). No  
7 diluente PIGPEL-5 é utilizada gema de ovo como crioprotetor extracelular, já no  
8 diluente PIGPEL5 *Plus* a gema de ovo foi substituída pela lipoproteína de baixa  
9 densidade (LDL), a qual foi obtida através do protocolo descrito por MOUSSA et  
10 al. (2002). Os diluentes foram confeccionados no mesmo laboratório a partir das  
11 mesmas soluções PA, equipamentos para elaboração, pesagem, diluição e  
12 envase e acrescidos de 500 UI de Penicilina por mL de diluente.

13 As doses foram calculadas com uma concentração de  $3,5 \times 10^9$   
14 espermatozóides em doses de 100 µL. Tal concentração foi alcançada através da  
15 utilização de espermiodensímetro, pelo qual é feita a adição de 1 µL de sêmen  
16 (pós coleta) em 9 µL de água destilada. Após suave homogeneização observa-se  
17 um determinado grau de turvação, o qual é classificado de acordo com a escala  
18 marcada no próprio densímetro. O grau de turvação demonstrado na escala  
19 possui uma concentração correspondente numa tabela do próprio equipamento,  
20 fornecendo desta forma a concentração em milhões de espermatozóides por  
21 mililitro do ejaculado analisado.

22 Todas as doses foram diluídas a uma temperatura de aproximadamente 35°C  
23 e passaram por um tempo de resfriamento de 3 h à temperatura de 22-24°C,  
24 sendo que após esse período foram acondicionadas de acordo com o tratamento  
25 em questão. As doses de sêmen que foram diluídas em diluente BTS foram  
26 acondicionadas em caixas térmicas à temperatura de 17°C, enquanto que as  
27 doses diluídas nos diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus* foram acondicionadas em  
28 caixas térmicas à temperatura de 5°C e 17°C.

## 29 **Experimento 2**

30 Nesta etapa do trabalho foram utilizados igualmente quatro ejaculados de  
31 cada macho. Foram utilizados os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus*, e os

procedimentos de coleta, diluição e envase foram os mesmos descritos anteriormente.

Neste experimento a diferença foi quanto ao acondicionamento das doses inseminantes. As doses de sêmen que foram diluídas em diluente PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus* foram acondicionadas em caixa acondicionadora de sêmen à temperatura de 5°C e em geladeira doméstica convencional (programada para temperatura em torno de 5°C).

Em ambos experimentos, o diluente PIGPEL5 *Plus* foi confeccionado utilizando-se as mesmas concentrações de LDL presentes na gema de ovo que foi utilizada na confecção do diluente PIGPEL-5. Logo, não houve incremento de LDL, mas sim a substituição da gema do diluente PIGPEL-5 pela lipoproteína, originando o diluente PIGPEL5 *Plus*.

## **Avaliação dos diluentes e dos ejaculados**

### **Osmolalidade e pH**

Os dados de osmolalidade e pH registrados durante o estudo foram coletados rotineiramente a partir dos diluentes, imediatamente após confeccionados; dos ejaculados *in natura*, logo após a coleta; e das doses produzidas. As análises de osmolalidade foram realizadas com a utilização do osmômetro LK -1000® (Laktron Indústria Eletrônica Ltda) e as análises de pH, com a utilização do pH-metro B 474® (Micronal).

### **Motilidade e Vigor**

As avaliações foram realizadas simultaneamente em microscopia óptica (aumento de 200x). As análises de motilidade (0 a 100%) e vigor (escala de 0 a 5) (MARTÍNEZ et al., 1996; BEARDEN & FUQUAY, 1997; TARDIF et al., 1999), foram feitas imediatamente após a coleta, após a diluição e ao longo do período de acondicionamento, ou seja, nas 24, 48 e 72h seguintes. Para as determinações de motilidade e vigor foram utilizados de 1 a 2 mL de sêmen a serem envasados em tubos cônicos de 15 mL, os quais foram incubados em banho-maria durante 10 minutos à 37°C. Após a deposição de 10 µl (microlitros)

1 de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas à 37°C, os dados foram  
2 coletados e registrados.

### 3 **Morfologia Espermática**

4 A avaliação da morfologia espermática consistiu em verificar todas as  
5 alterações de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda dos  
6 espermatozóides e foi realizada com o sêmen após a coleta e após a diluição em  
7 todos os tratamentos, bem como ao longo do período de acondicionamento, ou  
8 seja, nas 24, 48 e 72h após a coleta. O procedimento de preparação do teste  
9 iniciou com a deposição de 3 gotas de sêmen em 2 mL de formol salina em iguais  
10 temperaturas, para evitar alterações morfológicas provocadas por possível  
11 choque térmico. Após suave homogeneização, uma gota da amostra foi  
12 depositada sobre uma lâmina de microscopia e misturada com uma gota de  
13 corante eosina. Posteriormente a mistura foi coberta por uma lamínula, fixada sob  
14 suave pressão e lacrada nas bordas laterais com substância adesiva. A análise  
15 morfológica foi feita em microscópio com contraste de fases em aumento de 1.000  
16 vezes, com utilização de uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina, onde  
17 contou-se um total de 100 células por lâmina.

### 18 **Teste do Choque Hiposmótico**

19 A integridade funcional da membrana espermática foi testada através do teste  
20 do choque hiposmótico (CHIPO), no qual se utilizou uma solução hiposmótica de  
21 75 mOsm/kg e período de incubação de 5 minutos, sendo realizado  
22 primeiramente no momento pós-diluição (0h) em todos os tratamentos, e a seguir,  
23 nas 24, 48 e 72h de armazenamento das doses. O método utilizou solução  
24 hiposmótica confeccionada a partir de uma solução a base de frutose e água e  
25 uma solução a base de citrato de sódio e água. As duas soluções foram  
26 misturadas e a osmolalidade de 75 mOsm/kg da mistura alcançada com o auxílio  
27 do osmômetro. A solução isosmótica utilizada foi o diluente BTS, o qual possui  
28 osmolalidade de 312 mOsm/kg, sendo semelhante à osmolalidade do sêmen  
29 suíno. Para a realização do teste utilizou-se 900 µl de solução hiposmótica e 100  
30 µl de sêmen em *ependorf*, e após suave homogeneização, o mesmo foi incubado  
31 em banho-maria à 37°C, durante 5 minutos. O mesmo procedimento foi feito com a

1 solução isosmótica. Após a incubação, acrescentou-se uma gota de formol no  
2 *ependorf* que continha a solução isosmótica, provocando assim a morte dos  
3 espermatozóides que resistiram ao choque, para facilitar a leitura dos resultados.  
4 Em câmara de *Neubauer* (hemocitômetro) depositou-se 10 µl da mistura em  
5 solução hiposmótica sobre um dos compartimentos e 10 µl da mistura em solução  
6 isosmótica sobre o outro compartimento. Através de microscopia óptica com  
7 contraste de fases, em aumento de 400 vezes, procedeu-se à contagem de 100  
8 células, registrando o número de células que apresentaram cauda dobrada ou  
9 enrolada. Portanto, o valor que foi utilizado para análise do CHIPO, corresponde à  
10 diferença entre o número de espermatozóides com caudas enroladas, observadas  
11 no teste realizado com a solução hiposmótica e isosmótica (VASQUEZ et al.,  
12 1997).

### 13 **Controle de Temperatura**

14 As caixas térmicas (Minitub®) que serviram para o acondicionamento das  
15 doses durante o estudo são dotadas de termostatos reguláveis, conferindo, dessa  
16 forma, o controle das temperaturas de estocagem, conforme o diluente utilizado.  
17 A geladeira doméstica utilizada durante o experimento 2 não sofreu modificações  
18 quanto a sua capacidade de preservação da temperatura interna, sendo regulada  
19 simplesmente para manter a temperatura em 5°C, mantendo assim as  
20 características de uma geladeira comum.

21 As temperaturas do ambiente externo e do interior da geladeira doméstica  
22 foram aferidas diariamente às 8, 12 e 16h, com termômetro digital de precisão  
23 Incoterm® (Indústria de Termômetros), próprio para registro de temperaturas  
24 interna e externa, que registra máximas e mínimas alcançadas no período,  
25 permitindo assim informações sobre as variações de temperatura sofridas.

### 26 **Análise estatística**

27 Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando o programa  
28 STATISTIX® (2003). Para as variáveis dependentes: motilidade, integridade de  
29 membrana e morfologia foram realizadas análise de variância com medidas  
30 repetidas e feita comparação entre as médias através do teste LSD (Least

1 Significance Difference). Os resultados foram considerados significativos quando  
 2  $P < 0,05$ .

## 3 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 4 **Experimento 1**

5 Os dados referentes à osmolalidade, pH e presença de grumos dos diluentes  
 6 do experimento 1 encontram-se descritos na tabela 1.

7 Os valores para pH e osmolalidade do diluente BTS estão de acordo com os  
 8 citados pela bibliografia (HOLT, 2000; JOHNSON et al., 2000), assim como para  
 9 os diluentes PIGPEL-5 (CORRÊA et al., 2002) e PIGPEL5 *Plus*. A presença de  
 10 grumos foi classificada em escala de 0 a 3 para nenhuma presença ou muita  
 11 presença de grumos.

12  
 13 Tabela 1: Dados de grumos, osmolaridade e pH referentes aos diluentes

| Tratamentos                | Grumos | Osmolaridade<br>(mOsmol / kg de H <sub>2</sub> O) |                      | pH  |
|----------------------------|--------|---------------------------------------------------|----------------------|-----|
|                            |        |                                                   |                      |     |
|                            |        | Diluyente                                         | Sêmen +<br>Diluyente |     |
| BTS (17°C)                 | 0      | 318                                               | 325                  | 7,2 |
| PIGPEL-5 (17°C)            | 3      | 250                                               | 265                  | 7,0 |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (17°C) | 1      | 252                                               | 264                  | 7,3 |
| PIGPEL-5 (5°C)             | 3      | 250                                               | 265                  | 7,0 |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (5°C)  | 1      | 252                                               | 265                  | 7,3 |

14  
 15 Os resultados para motilidade espermática nos diferentes diluentes e períodos  
 16 de avaliação estão apresentados na Tabela 2. Na avaliação das 24h, o diluyente  
 17 PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus*, ambos à 17°C, foram superiores ( $P < 0,05$ ) ao diluyente  
 18 BTS. O diluyente PIGPEL-5 à 5°C mostrou-se superior ( $P < 0,05$ ) ao diluyente BTS  
 19 às 48 e 72h e ao PIGPEL-5 à 17°C às 72h ( $P < 0,05$ ).

20 Tais resultados demonstram que o diluyente PIGPEL-5 foi eficiente na  
 21 manutenção do padrão para motilidade espermática à 5°C em valores aceitáveis  
 22 de acordo com recomendações do CBRA (1998). Além disso, o diluyente foi

versátil na manutenção da motilidade tanto à 5°C como à 17°C, especialmente até 48h de acondicionamento, comprovando o efeito benéfico do diluente PIGPEL-5 como mostrado por CORRÊA et al. (2002). Não foi observado benefício com a adição de LDL (PIGPEL5 *Plus*) em comparação com o PIGPEL-5 na motilidade à 5 ou 17°C.

Tabela 2: Motilidade espermática nos diferentes diluentes durante o período de acondicionamento

| Tratamentos                | Motilidade nos períodos de avaliação |                    |                    |                    |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                            | 0 h                                  | 24 h               | 48 h               | 72 h               |
| BTS (17°C)                 | 70,8 <sup>a</sup>                    | 55,0 <sup>b</sup>  | 45,0 <sup>b</sup>  | 33,3 <sup>b</sup>  |
| PIGPEL-5 (17°C)            | 75,8 <sup>a</sup>                    | 74,2 <sup>a</sup>  | 53,3 <sup>ab</sup> | 26,7 <sup>b</sup>  |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (17°C) | 75,0 <sup>a</sup>                    | 74,2 <sup>a</sup>  | 68,3 <sup>a</sup>  | 50,8 <sup>ab</sup> |
| PIGPEL-5 (5°C)             | 75,8 <sup>a</sup>                    | 69,2 <sup>ab</sup> | 65,0 <sup>a</sup>  | 65,0 <sup>a</sup>  |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (5°C)  | 75,8 <sup>a</sup>                    | 60,0 <sup>ab</sup> | 58,5 <sup>ab</sup> | 54,2 <sup>ab</sup> |

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, significa diferença estatística (P<0,05)

Os resultados referentes à integridade da membrana espermática, avaliados através do teste do choque hiposmótico (CHIPO) estão descritos na Tabela 3, onde se evidenciou a superioridade (P<0,05) do diluente PIGPEL-5 *Plus* à 17°C nas 48h de acondicionamento, quando comparado com os diluentes à 5°C, sendo também superior (P<0,05) aos diluentes PIGPEL-5 à 17°C e BTS, nas 72h.

Os valores achados são compatíveis com dados achados em outros trabalhos (VASQUEZ et al., 1997; TONIETO et al., 2002; JULIANO et al., 2002). Houve um benefício com a presença de LDL à 17°C sobre a integridade de membrana, o que pode indicar o efeito prejudicial da temperatura à 5°C e também a presença de componentes na gema de ovo que tenham prejudicado a manutenção da integridade da membrana.

Tabela 3: Integridade funcional da membrana espermática através do CHIPO (média)

| Tratamentos                | Integridade funcional da membrana plasmática nos períodos de avaliação |                   |                    |                    |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                            | 0 h                                                                    | 24 h              | 48 h               | 72 h               |
| BTS (17°C)                 | 8,3 <sup>a</sup>                                                       | 6,17 <sup>a</sup> | 3,67 <sup>ab</sup> | 3,00 <sup>b</sup>  |
| PIGPEL-5 (17°C)            | 8,1 <sup>a</sup>                                                       | 8,33 <sup>a</sup> | 4,25 <sup>ab</sup> | 1,83 <sup>b</sup>  |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (17°C) | 9,8 <sup>a</sup>                                                       | 5,17 <sup>a</sup> | 12,50 <sup>a</sup> | 10,00 <sup>a</sup> |
| PIGPEL-5 (5°C)             | 6,0 <sup>a</sup>                                                       | 3,00 <sup>a</sup> | 2,50 <sup>b</sup>  | 4,17 <sup>ab</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (5°C)  | 6,3 <sup>a</sup>                                                       | 3,00 <sup>a</sup> | 2,67 <sup>b</sup>  | 5,50 <sup>ab</sup> |

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, significa diferença estatística ( $P < 0,05$ )

A morfologia espermática normal no diluente PIGPEL5 *Plus* à 0h foi superior ( $P < 0,05$ ) quando comparada aos diluentes PIGPEL-5 à 17°C e PIGPEL-5 à 5°C (Tabela 4). Entretanto, nos demais momentos de avaliação, não houve diferenças quanto ao percentual de espermatozóides com morfologia normal entre os diferentes diluentes ( $P > 0,05$ ). As amostras de morfologia coletadas na 0h não eram diluídas em nenhum dos diluentes, sendo misturadas ao formol imediatamente após a coleta do sêmen. É possível que a adversidade dos resultados encontrados na 0h em relação às demais horas esteja relacionada com um choque de temperatura ocorrido no momento da diluição com formol, diminuindo assim o percentual de espermatozóides normais.

Tabela 4: Morfologia espermática normal nos diferentes diluentes (média)

| Tratamentos                | Morfologia espermática normal nos períodos de avaliação |                   |                   |                   |
|----------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                            | 0 h                                                     | 24 h              | 48 h              | 72 h              |
| BTS (17°C)                 | 87,3 <sup>abc</sup>                                     | 84,7 <sup>a</sup> | 79,3 <sup>a</sup> | 82,2 <sup>a</sup> |
| PIGPEL-5 (17°C)            | 84,7 <sup>c</sup>                                       | 86,2 <sup>a</sup> | 88,8 <sup>a</sup> | 87,8 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (17°C) | 89,3 <sup>a</sup>                                       | 91,1 <sup>a</sup> | 81,4 <sup>a</sup> | 91,2 <sup>a</sup> |
| PIGPEL-5 (5°C)             | 85,2 <sup>bc</sup>                                      | 85,3 <sup>a</sup> | 83,1 <sup>a</sup> | 84,7 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> (5°C)  | 87,7 <sup>ab</sup>                                      | 87,8 <sup>a</sup> | 80,2 <sup>a</sup> | 88,4 <sup>a</sup> |

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, significa diferença estatística ( $P < 0,05$ )



1 Embora com diferenças a 0h, os valores para morfologia estão de acordo com  
2 os padrões recomendados para a espécie (CBRA, 1998).

3 Conforme anteriormente demonstrado por outros autores (AMIRAT et al.,  
4 2004; BERGERON et al., 2004; MAJUNATH et al., 2002), a fração LDL da gema  
5 de ovo é a responsável pelo efeito protetor das células espermáticas submetidas  
6 ao congelamento ou a refrigeração. QUINN & CHOW et al. (1980) sugeriram que  
7 os fosfolipídios da LDL poderiam formar um filme protetor envolta da membrana  
8 espermática, protegendo-a, dessa forma, contra o choque térmico. Já  
9 BERGERON et al (2004), demonstraram que a LDL diminui a ligação das  
10 proteínas do plasma seminal (BSP) ao espermatozóide, prevenindo o efluxo de  
11 fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática. As BSP, que entram em  
12 contato com a célula espermática durante a ejaculação, seqüestram os  
13 fosfolipídios (BERGERON et al., 2004; THERIEN et al., 1999) e o colesterol da  
14 membrana celular, tornando-a mais suscetível ao choque térmico, provavelmente  
15 pela alteração na relação colesterol/fosfolipídio. A LDL também promove a  
16 entrada de fosfolipídio e colesterol para a membrana espermática, conferindo uma  
17 maior resistência contra o choque térmico. Resultados similares também foram  
18 observados em experimentos utilizando sêmen das espécies bovina (MOUSSA et  
19 al., 2002) e ovina (YILDIZ et al., 2000).

## 20 **Experimento 2**

21 Os dados referentes aos diluentes utilizados neste experimento estão  
22 descritos na Tabela 5.

23 Assim como no experimento anterior, os valores de pH e osmolalidade dos  
24 diluentes estão de acordo com valores citados pela bibliografia (CORRÊA et al.,  
25 2002).

26

1 Tabela 5: Dados de grumos, osmolaridade e pH referentes aos diluentes

| Tratamentos                            | Grupos | Osmolaridade                      |                      | pH   |
|----------------------------------------|--------|-----------------------------------|----------------------|------|
|                                        |        | (mOsmol / kg de H <sub>2</sub> O) |                      |      |
|                                        |        | Diluyente                         | Sêmen +<br>Diluyente |      |
| PIGPEL-5 Caixa Acond. (5°C)            | 3      | 252                               | 262                  | 6,76 |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Caixa Acond. (5°C) | 1      | 259                               | 261                  | 7,07 |
| PIGPEL-5 Geladeira (± 5°C)             | 3      | 252                               | 261                  | 6,76 |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Geladeira (± 5°C)  | 1      | 259                               | 262                  | 7,07 |

2  
3 Os resultados de motilidade espermática referentes ao experimento 2 estão  
4 descritos na Tabela 6. Não houve diferenças entre os diluentes utilizados  
5 ( $P>0,05$ ), na avaliação da motilidade. É importante ressaltar que os diluentes  
6 PIGPEL-5 e PIGPEL5 *Plus*, nas suas diferentes formas de acondicionamento,  
7 ainda que acondicionados à 5°C, proporcionaram adequada motilidade de acordo  
8 com recomendações do CBRA (1998), mostrando a eficácia dos diluentes em  
9 prevenir o choque térmico.

10 Quando o espermatozóide suíno é exposto ao resfriamento, especialmente  
11 abaixo de 12°C (ALTHOUSE et al., 1998), a célula pode sofrer o chamado  
12 “choque térmico”, que pode induzir a danos irreversíveis com perda da viabilidade  
13 dos espermatozóides (JOHNSON et al., 2000). Com o resfriamento do sêmen,  
14 ocorre a transição da membrana plasmática do estado fluído para o estado de gel,  
15 em que podem ocorrer aglomerações irreversíveis das proteínas da membrana  
16 celular, além da liberação de partículas no interior da membrana plasmática (DE  
17 LEEUW et al., 1990), tais como lipídios (BWANGA, 1991; MULLER et al., 1999).  
18 Isso leva a uma instabilidade das interações entre as proteínas e os fosfolipídios  
19 constituintes da membrana. Além disso, tendem a ocorrer alterações na  
20 polaridade celular, que resultariam em uma mudança na conformação destes  
21 constituintes celulares e consequentes alterações estruturais e funcionais da  
22 célula espermática, que caracterizam o choque térmico (BUHR, 1991; BUHR et  
23 al., 1994; DENNISTON et al., 2000).

Tabela 6: Motilidade espermática nos diferentes diluentes e períodos de avaliação (média)

| Tratamentos                            | Motilidade nos períodos de avaliação |                   |                   |                   |
|----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                        | 0 h                                  | 24 h              | 48 h              | 72 h              |
| PIGPEL-5 Caixa Acond. (5°C)            | 76,7 <sup>a</sup>                    | 72,5 <sup>a</sup> | 65,8 <sup>a</sup> | 60,8 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Caixa Acond. (5°C) | 76,7 <sup>a</sup>                    | 70,0 <sup>a</sup> | 64,2 <sup>a</sup> | 58,3 <sup>a</sup> |
| PIGPEL-5 Geladeira (± 5°C)             | 76,7 <sup>a</sup>                    | 70,8 <sup>a</sup> | 67,5 <sup>a</sup> | 64,2 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Geladeira (± 5°C)  | 76,7 <sup>a</sup>                    | 69,2 <sup>a</sup> | 61,7 <sup>a</sup> | 58,3 <sup>a</sup> |

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, significa diferença estatística (P<0,05)

Os valores correspondentes à integridade funcional da membrana estão descritos na Tabela 7. Os diluentes testados não diferiram entre si (P>0,05) em nenhum dos momentos de avaliação.

A gema de ovo integral é composta de substâncias que, em detrimento das suas características benéficas como crioprotetor, podem dificultar a respiração celular e conseqüentemente ter efeitos prejudiciais sobre a funcionalidade da membrana (TOSIC et al., 1946). Dentre elas: grânulos, minerais e a fração lipoproteína de alta densidade, sendo que esta última potencializa a ação das proteínas do plasma seminal no efluxo de fosfolipídio e colesterol da membrana espermática (THERIEN et al., 1999). Entretanto, a substituição da gema de ovo pela LDL (PIGPEL5 *Plus*) não apresentou benefícios quanto à integridade funcional da membrana espermática.

Tabela 7: Integridade funcional da membrana espermática através do CHIPO (média)

| Tratamentos                            | Integridade funcional da membrana plasmática nos períodos de avaliação |                  |                   |                  |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|
|                                        | 0 h                                                                    | 24 h             | 48 h              | 72 h             |
| PIGPEL-5 Caixa Acond. (5°C)            | 3,4 <sup>a</sup>                                                       | 0,5 <sup>a</sup> | 0,5 <sup>b</sup>  | 2,6 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Caixa Acond. (5°C) | 3,3 <sup>a</sup>                                                       | 1,4 <sup>a</sup> | 2,7 <sup>ab</sup> | 1,2 <sup>a</sup> |
| PIGPEL-5 Geladeira (± 5°C)             | 3,5 <sup>a</sup>                                                       | 1,7 <sup>a</sup> | 1,1 <sup>b</sup>  | 3,3 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Geladeira (± 5°C)  | 3,3 <sup>a</sup>                                                       | 2,2 <sup>a</sup> | 2,5 <sup>ab</sup> | 2,0 <sup>a</sup> |

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, significa diferença estatística (P<0,05)

A morfologia espermática normal (Tabela 8) não demonstrou diferenças estatísticas ( $P>0,05$ ) entre os diluentes testados durante todo o período de acondicionamento.

Os resultados obtidos demonstram que os diluentes utilizados à 5°C foram eficazes em preservar a morfologia espermática dentro de padrões recomendados pelo CBRA (1998), independente da forma de acondicionamento.

Tabela 8: Morfologia espermática normal nos diferentes diluentes (média)

| Tratamentos                                             | Morfologia espermática normal nos períodos de avaliação |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                         | 0 h                                                     | 24 h              | 48 h              | 72 h              |
| PIGPEL-5 Caixa Acond. (5°C)                             | 85,8 <sup>a</sup>                                       | 83,7 <sup>a</sup> | 83,7 <sup>a</sup> | 83,4 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Caixa Acond. (5°C)                  | 86,9 <sup>a</sup>                                       | 86,2 <sup>a</sup> | 84,4 <sup>a</sup> | 84,8 <sup>a</sup> |
| PIGPEL-5 Geladeira ( $\pm 5^\circ\text{C}$ )            | 85,7 <sup>a</sup>                                       | 86,7 <sup>a</sup> | 83,0 <sup>a</sup> | 83,7 <sup>a</sup> |
| PIGPEL5 <i>Plus</i> Geladeira ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) | 81,8 <sup>a</sup>                                       | 83,1 <sup>a</sup> | 86,0 <sup>a</sup> | 79,8 <sup>a</sup> |

Não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) entre os valores, na mesma coluna.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, ficou demonstrada a eficácia do diluente PIGPEL-5 quando acondicionado à 5°C e à 17°C, com gema de ovo ou na substituição desta por LDL (PIGPEL5 *Plus*), bem como pelo acondicionamento do sêmen em caixa acondicionadora ou geladeira doméstica, mantendo a qualidade espermática de acordo com os testes de motilidade, morfologia e integridade funcional da membrana.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
- 2 ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C. et al. Characterization of lower
- 3 temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen.
- 4 **Theriogenology**. v. 50; p. 535-543. 1998.
- 5 AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen *in vitro* fertility
- 6 after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a
- 7 commercial egg yolk extender. **Theriogenology**. v. 61, p. 895-907. 2004.
- 8 ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M. et al. Chemical and
- 9 structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk.
- 10 **Food Chemistry**. v. 83; p. 175-183. 2003.
- 11 BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY,
- 12 J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997a.
- 13 Cap. 14, p.147-157.
- 14 BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.;
- 15 FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall,
- 16 1997b. Cap. 15, p.159-170.
- 17 BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y. et al. Low-density lipoprotein fraction
- 18 from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal
- 19 plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of**
- 20 **Reproduction**. v. 70; p. 708-717. 2004.
- 21 BOSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. et al. Comparison
- 22 of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo*
- 23 fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents.
- 24 **Theriogenology**. v. 50; p. 699-706. 1998.
- 25 BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. In:
- 26 JOHNSON, L.A.; RATH, D. Eds.: Boar Semen Preservation II. **Proceedings II**
- 27 **International Conference Boar Semen Preservation**. Reproduction Domestic
- 28 Animal. (*Suppl. 1*). Beltsville, Maryland USA. p. 81-93. 1991.
- 29 BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head
- 30 membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**. v. 31; p.
- 31 224-238. 1994.

- 1 BUHR, M.M.; HE, L.; KASIMANICKAM, V. Lipid in extenders affect boar sperm  
2 function during cryopreservation. *In*: Johnson, L.A., Guthrie, H.D. Eds., Boar  
3 Semen Preservation. **Proc. IV International Conference of Boar Semen**  
4 **Preservation**. Beltsville, Maryland USA, p. 61-69. 2000.
- 5 BWANGA, C.O. Criopreservation of boar semen I: a literature review. **Acta**  
6 **Veterinaria Scandinavia**. v. 32; p. 431-453, 1991.
- 7 CBRA: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame**  
8 **andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. [s.l.], 1998. p.35-40.
- 9 CONACANNON, P.W.; BATISTA, M. Canine semen freezing and artificial  
10 insemination. *In*: Veterinary Terapy ; 10. Philadelphia W. B. 1989; p.1247-1259.
- 11 CORRÊA, M.N. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de sêmen suíno preservado a 5°C com  
12 o diluente PIGPEL-5. **Tese de Doutorado em Biotecnologia**. UFPel-RS. p. 138.  
13 2002.
- 14 DE LEEUW, F.E., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. The role membrane  
15 damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic**  
16 **Animals**. Suppl. v.1, 95-104. 1990.
- 17 DELGADO, C.; ROSENGRANT, M.; STEINFELD, H. et al. Livestock to 2020: The  
18 next food revolution. Rome, Italy: **FAO**; 72p. 1999.
- 19 DEMANOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg  
20 yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of  
21 the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 31, p. 279-280.  
22 1996.
- 23 DENNISTON, R.S.; MICHELET, S.; GODKE, R. Principles of cryopreservation. *In*:  
24 C.L. BROWDY. **Cryopreservation in Aquatic Species**. v. 7; p. 59-74. 2000.
- 25 DESCHAMPS, J.C.; BASTOS, R.G.; NICOLA, E.S. Avanços da biotecnologia em  
26 suínos. **Ciência Animal**. v. 7, 79-88. 1997.
- 27 ENGLAND, G.C. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of**  
28 **Reproduction Fertility**. Suppl 1993; v. 47; p. 247-255.
- 29 FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the  
30 motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**.; v.  
31 49; p. 277-284. 1977.

- 1 GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L. A. et al. Perspectives for artificial  
2 insemination and genomics to improve global swine populations. Proceedings of  
3 the V International Conference on Boar Semen Preservation. Doorwerth, The  
4 Netherlands. **Theriogenology**. v. 63, 283-299. 2005.
- 5 GRAHM JK; FOOTE RH. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree  
6 of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing.  
7 **Cryobiology**. v. 24; p. 42-52. 1987.
- 8 HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of  
9 species and individual differences. **Theriogenology**. v.53; p. 47-58. 2000.
- 10 HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction**  
11 **Science**. v. 62, p. 3-22. 2000.
- 12 JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P. et al. Storage of boar semen. **Animal**  
13 **Reproduction Science**. v .62, 143-172. 2000.
- 14 JULIANO, F; COLLARES, T; TONIETO, S. R. et al. Choque hipoosmótico em  
15 espermatozóides suínos relacionado com os testes convencionais de avaliação da  
16 qualidade espermática. In: I Congresso Latino Americano de Suinocultura.  
17 **Anais...** Foz do Iguaçu, 2002. p. 195-196.
- 18 LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and  
19 where we go from here. In: JOHNSON, L.A., GUTHRIE, H.D. Eds. Boar Semen  
20 Preservation. **Proceedings IV International Conference on Boar Semen**  
21 **Preservation**. Beltsville, Maryland USA, 121-128, 2000.
- 22 MAJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major Proteins of bovine  
23 seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk.  
24 **Biology of Reproduction**. v.67; p. 1250-1258. 2002.
- 25 MARTÍNEZ, E.; VÁSQUEZ, J.M.; MATÁS, C. et al. Oocyte penetrationn by fresh  
26 or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation  
27 treatments. **Biology of Reproduction**. v. 55, p.134-140. 1996
- 28 MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins  
29 extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-  
30 thawed bull semen. **Theriogenology**. v. 57; p. 1695-1706. 2002.
- 31 MULLER, K.; POMORSKI, T.; MULLER, P. et al. Stability of transbilayer  
32 phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. **Journal of**  
33 **Cell Science**. v. 112; p. 11-20. 1999.

- 1 NRC: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requeriments of Swine**. 10<sup>th</sup>  
2 ed. National Academy Press, Washington, DC. 1998. 189p.
- 3 PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine  
4 spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**. v. 39; p.1144-1149.  
5 1974.
- 6 POLGE, C. Artificial insemination in pigs. **Vet. Rec.** v. 68, p. 62-76. 1956.
- 7 POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospolipid-bound fatty  
8 acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Compendio of Biochemisty**  
9 **Physiology**. v. 46, p. 541-545. 1973.
- 10 PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing  
11 capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of**  
12 **Animal Science**. v. 40, p. 99-102. 1975.
- 13 QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W. Evidence that phospholipids protects spermatozoa  
14 from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction Fertility**  
15 v.60; p. 403-407. 1980.
- 16 ROPPA, L. A suinocultura no mundo. **Porkworld**, p. 14-37, Anuário. 2004.
- 17 STATISTIX®. **Statistix® 8 Analytical Software**. User's manual. Tallahassee. FL.  
18 2003. 396 p.
- 19 TARDIF, S.; LAFOREST, J.P.; CORMIER, N. et al. The importance of porcine  
20 sperm parameters on fertility *in vivo*. **Theriogenology**. v. 52, p. 447-459. 1999.
- 21 THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma  
22 phospholipid-binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm.  
23 **Theriogenology**. v. 61; p. 590-598. 1999.
- 24 TONIETTO, S.R.; JULIANO, F.; COLLARES, et al. Influência do técnico na  
25 avaliação de espermatozóides suínos submetidos ao choque hipoosmótico. In: I  
26 Congresso Latino Americano de Suinocultura. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2002. p.  
27 193-194.
- 28 TOSIC, P.H.; WALTON, A. Effects of egg yolk and its contituents on the respiration  
29 and fertilizing capacity of spermatozoa. **Journal of Agriculture Science**. v. 37; p.  
30 69-76. 1946.
- 31 VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of  
32 boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane.  
33 **Theriogenology**. v. 47, p. 913-922, 1997.



- 1 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
- 2 **Reproduction Science.** p. 60 – 61; 481 – 492. 2000.
- 3 WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa
- 4 at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction Fertility.**; v. 62;
- 5 p. 483-492. 1981.
- 6 WEITZE, K.F. The use of long-term extender in pig AI - a view of the international
- 7 situation. **Pig News Inform.** v. 11, p. 23-26. 1990.
- 8 YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M. et al. Influence of sugar supplementation of the
- 9 extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during
- 10 freezing. **Theriogenology.** v. 54; p. 579-585. 2000.