

Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5°C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia

Viability of swine semen stored at 5°C according to the cooling rate and previous incubation

Lia Helena Katzer¹ Mari Lourdes Bernardi² Fernando Pandolfo Bortolozzo³ Ivo Wentz³

RESUMO

Foram realizados dois experimentos para avaliar o efeito da incubação prévia e da taxa de resfriamento sobre a viabilidade de sêmen suíno resfriado. Doses de sêmen de 100ml, com três bilhões de espermatozoides, foram armazenadas a 17°C ou 5°C. Foram avaliados os percentuais de motilidade (MOT), de acrossomas normais (ACN) e de membranas íntegras (MI). Foram coletados 5 e 6 ejaculados de 6 e 4 machos, nos experimentos I e II, respectivamente. No experimento I, foram comparados três tratamentos: armazenamento a 17°C (T1); a 5°C com incubação prévia de 24h a 17°C (T2) e a 5°C, após queda lenta (cerca de 15h para chegar a 5°C) de temperatura (T3). O T1 apresentou melhores resultados ($P < 0,05$) de MOT e MI em comparação aos T2 e T3. Não houve diferença ($P > 0,05$) de MOT e MI entre T2 e T3 e de ACN ($P > 0,05$, entre os três tratamentos). No experimento II, foram avaliados 4 tratamentos: armazenamento a 17°C (T1); a 5°C com incubação de 24h a 17°C (T2); a 17°C com incubação prévia de 8h a 22°C (T3) e a 5°C com duas temperaturas e períodos de incubação (T4; 22°C por 8h e 17°C por 16h). Não houve diferença ($P > 0,05$) de MOT, ACN e MI entre T1 e T3 e, também, entre T2 e T4. O armazenamento a 17°C (T1 e T3) apresentou MOT e MI ($P < 0,05$) superiores ao armazenamento a 5°C (T2 e T4), a partir das 72h. A curva lenta de resfriamento ou a incubação prévia de 24h a 17°C bem como a incubação por 24h a 17°C ou por 8h a 22°C mais 16h a 17°C não afetam a viabilidade do sêmen armazenado a 5°C. O resfriamento a 5°C ainda precisa ser otimizado de modo a obter viabilidade espermática semelhante à observada a 17°C.

Palavras-chave: incubação, sêmen, suíno, resfriamento.

ABSTRACT

Two experiments were carried out to evaluate the effect of previous incubation and cooling rate on the viability of swine

cooled semen. Semen doses of 100ml, containing three billion spermatozoa, were stored at 17°C or 5°C. Percentages of motility (MOT), normal acrosomes (ACN), and intact membranes (MI) were evaluated. A number of 5 and 6 ejaculates were collected from 6 and 4 boars in experiments I and II, respectively. In experiment I, three treatments were compared: storage at 17°C (T1); storage at 5°C with 24h incubation at 17°C (T2), and at 5°C, after a slow (about 15h to reach 5°C) temperature decrease (T3). T1 presented better results ($P < 0.05$) for MOT and MI as compared to T2 and T3. No difference ($P > 0.05$) was found in MOT and MI between T2 and T3 and in ACN ($P > 0.05$) among the three treatments. In experiment II, 4 treatments were evaluated: storage at 17°C (T1); at 5°C with 24h incubation at 17°C (T2); at 17°C with previous 8h incubation at 22°C (T3), and storage at 5°C (T4) with two incubation temperatures and periods (at 22°C for 8h and at 17°C for 16h). No difference ($P > 0.05$) was verified in MOT, ACN and MI between T1 and T3 and also between T2 and T4. Storage at 17°C (T1 and T3) presented better MOT and MI ($P < 0.05$) as compared to storage at 5°C (T2 and T4), from 72h onwards. Previous incubation or slow temperature decrease as well as incubation for 24h at 17°C or for 8h at 22°C plus 16h at 17°C do not affect the viability of semen stored at 5°C. Cooling to 5°C still needs to be optimized so that viability be similar to that observed at 17°C.

Key words: incubation, cooling, semen, swine.

INTRODUÇÃO

A temperatura de armazenamento do sêmen suíno, entre 15 e 18°C, não interrompe totalmente o metabolismo dos espermatozoides, que continuam produzindo metabólitos, os quais se acumulam e

¹Médico Veterinário, Mestre, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS.

²Médico Veterinário, Doutor, Professor da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS.

³Médico Veterinário, Doutor, Professor, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS. E-mail : ivowentz@ufrgs.br. Autor para correspondência.

interferem na motilidade espermática. Além disso, essa temperatura não impede a multiplicação bacteriana, a qual pode afetar a qualidade do sêmen (WEITZE, 1990). Teoricamente, quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, menor seria o metabolismo e maior poderia ser o tempo de armazenamento do sêmen. O armazenamento do sêmen suíno em temperaturas próximas a 5°C seria uma vantagem, uma vez que o mesmo poderia permanecer estocado em refrigeradores domésticos (LANDSVERK, 2000), o que seria conveniente para a maioria dos produtores. No entanto, o espermatozóide suíno é sensível a temperaturas inferiores a 15°C, abaixo da qual há significativa redução da motilidade (DE LEEUW et al., 1990).

A membrana espermática apresenta uma composição mista de fosfolipídios que pode diferir de espécie para espécie, além da temperatura de transição de fase ser variável para cada tipo de fosfolipídio (BUHR et al., 1994). Durante o resfriamento, a separação lateral de fases pode ocorrer e as proteínas ficarem agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado líquido. Pelo fato de as proteínas da membrana ficarem localizadas em ambiente lipídico não fisiológico, a função das mesmas, importante para a integridade estrutural ou para o funcionamento das bombas de íons, pode ser afetada (WATSON, 1996; WOELDERS, 1997; LEVIS, 2000). Em função da separação de fases, há aumento da permeabilidade da membrana com perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática e perturbações nos processos de difusão controlados pela membrana (DE LEEUW et al., 1990/1991). Além disso, durante o resfriamento, o desequilíbrio iônico intra e extracelular pode reduzir a motilidade espermática (WATSON, 1996). Na faixa de temperatura de 25 a 5°C, ocorre a redução da fluidez dos lipídios da membrana do espermatozóide suíno, o que poderia explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (BUHR et al., 1994). Um componente importante que participa da integridade da membrana plasmática é o colesterol. A relação colesterol: fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozóide suíno é mais baixa (0,12) do que a dos espermatozóides bovinos (0,38) e ovinos (0,36), podendo ser outro fator responsável pela sua maior sensibilidade ao resfriamento (DE LEEUW et al., 1990).

Em suínos, há poucos estudos avaliando o efeito da velocidade de resfriamento ou do tempo e da temperatura de incubação prévia sobre a viabilidade do sêmen armazenado a 5°C. WEBER (1989), ao

estudar o armazenamento do sêmen suíno a 5°C, verificou que a colocação direta a 5°C causa queda brusca da motilidade e do percentual de acrossomas normais. De percentuais de 82% de motilidade e 96% de acrossomas normais, no sêmen recém diluído, houve queda para 12% e 45%, respectivamente, após o resfriamento a 5°C. WATSON & PLUMMER (1985) observaram lesões irreversíveis nos espermatozóides, ao utilizarem taxa de resfriamento de 10 a 15°C min⁻¹, e concluíram que a severidade do efeito do choque térmico está na dependência da velocidade de resfriamento.

Nos estudos desenvolvidos para viabilizar o armazenamento do sêmen suíno em temperaturas inferiores a 15°C, foi evidenciado que os efeitos relacionados ao choque térmico foram amenizados quando o sêmen permanecia por certo período incubado em temperaturas acima de 15°C (PURSEL et al., 1972a; TAMULI & WATSON, 1994). Além disto, foi verificado que o resfriamento gradual resulta em maior viabilidade espermática que o resfriamento direto (WEBER, 1989; WEITZE et al., 2000).

No presente estudo, foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar se a viabilidade do sêmen suíno armazenado a 5°C poderia ser melhorada pela queda lenta de temperatura (experimento I) ou pela incubação prévia em temperaturas acima de 15°C (experimentos I e II), utilizando como controle sêmen armazenado a 17°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com sêmen proveniente de duas Centrais de Inseminação Artificial do RS. Foram obtidos 5 e 6 ejaculados, com intervalo de uma semana, de cada um dos 6 e 4 machos suínos sexualmente maduros, utilizados na rotina de coletas das Centrais. Em cada dia de coleta, todos os machos eram coletados. Os experimentos I e II foram desenvolvidos nos períodos de agosto a setembro de 2000 e de novembro a dezembro de 2000, respectivamente. Os machos coletados eram das raças Landrace, Large-White, Duroc ou Híbridos, com idade entre 12 e 30 meses.

A coleta de sêmen foi realizada pelo método da mão enluvada (HANCOCK & HOVELL, 1959), com manequim regulável, em sala de coleta. A fração rica e pobre do sêmen foram coletadas em um saco plástico descartável protegido por recipiente térmico, previamente aquecido a 38°C, contendo uma dupla camada de gaze, acoplada na sua parte superior, para a separação da fração gelatinosa. Após a coleta do sêmen, foram avaliados a coloração, volume, aspecto

e odor para fins de descarte das amostras que não estivessem dentro dos padrões normais para essas características. O sêmen foi mantido em banho-maria a 32-34°C, enquanto foram avaliados a motilidade, o grau de aglutinação e a concentração espermática, esta última por fotocolorimetria (SpermaCue®). O grau de aglutinação foi determinado de forma subjetiva em escala de 0 a 3, correspondendo respectivamente à ausência de aglutinação e aglutinação intensa. Uma alíquota do sêmen *in natura* (0,2 a 0,3ml) foi colocada em 2ml da solução formol-citrato 2,94% para a avaliação da morfologia espermática. Os critérios utilizados para a escolha dos ejaculados resfriados foram os de motilidade superior a 70% e alterações morfológicas inferiores a 20%. A motilidade média do sêmen *in natura* foi de 88% \pm 3,4, com variação de 80 a 90%.

O sêmen foi diluído em BTS (LEVIS, 2000), a 32-34°C, com 3 bilhões de espermatozoides em 100 ml, sendo envasado em bisnagas plásticas. O sêmen diluído foi transportado em embalagem isotérmica, a 22°C, até o laboratório de conservação e análise. O período máximo de transporte, entre o local de coleta e o laboratório, foi de 2h. Após o período de duas horas a 22°C, as amostras foram submetidas aos diferentes tratamentos, dentro de cada experimento. Cada ejaculado foi fracionado e submetido a todos os tratamentos, dentro de cada experimento. No experimento I, foram comparados três tratamentos: armazenamento a 17°C (T1); a 5°C com incubação prévia de 24h a 17°C (T2) e colocação das doses de sêmen em caixa de isopor contendo 1000ml de água, a 20°C, a qual foi colocada a 5°C para obter queda lenta da temperatura (T3). No experimento II, foram comparados quatro tratamentos: armazenamento a 17°C (T1); a 5°C com incubação de 24h a 17°C (T2); a 17°C com incubação prévia de 8h a 22°C (T3) e a 5°C com duas temperaturas e períodos de incubação (T4; 22°C por 8h e 17°C por 16h).

Nos dois experimentos, as amostras de sêmen foram mantidas sob resfriamento por 120h. As temperaturas de armazenamento utilizadas foram 17 \pm 1°C ou 5 \pm 1°C, conforme os tratamentos de cada experimento. A temperatura de armazenamento foi monitorada diariamente, com termômetro de máxima e mínima presente no interior da conservadora.

Para o controle da queda de temperatura, introduziu-se o sensor do termômetro digital Full Gauge® (com precisão de 0,1°C e limite operacional de -25 a +70°C) no centro da amostra de 100ml de sêmen, envasada em bisnagas plásticas. Para evitar possíveis problemas de contaminação com a manutenção do termômetro nas amostras submetidas

aos diferentes tratamentos, foram utilizadas amostras de sêmen especificamente para efetuar a medida de temperatura. A temperatura foi medida de 10 em 10 minutos. Para o cálculo da taxa média de resfriamento, foram utilizados os valores obtidos nas três repetições efetuadas para cada curva. Nos tratamentos em que houve incubação a 17°C, foi desconsiderado o período em que as doses permaneceram nesta temperatura (16 ou 24h), dependendo do experimento em questão. A velocidade de queda de temperatura das curvas de resfriamento utilizadas nos dois experimentos está apresentada na tabela 1.

A qualidade do sêmen foi avaliada pelos percentuais de motilidade (MOT), de acrossomas morfológicamente normais (ACN) e de membranas espermáticas íntegras (MI). No experimento I, todas os parâmetros foram avaliados nas 48, 72, 96 e 120h de armazenamento. No experimento II, a avaliação de ACN foi efetuada somente nas 120h de armazenamento.

De cada amostra, após sua remoção da incubadora, era obtida uma alíquota de 1ml de sêmen, a qual foi mantida a 37°C por 10 minutos. O percentual de espermatozoides móveis foi determinado por avaliação entre lâmina e lamínula, pelo método subjetivo, em microscópio de campo claro, com aumento de 100x.

O percentual de acrossomas morfológicamente normais foi determinado conforme PURSEL et al. (1972a), a partir da mistura de uma alíquota de 40 μ l de sêmen resfriado com 1ml de solução formol-citrato 2,94%. Uma gota foi depositada entre lâmina e lamínula e a morfologia do acrossoma de 200 espermatozoides foi avaliada em microscópio óptico de contraste de fase (1000x).

A integridade das membranas foi avaliada com base no método de HARRISON & VICKERS (1990), sendo que uma solução contendo 475 μ l de sêmen resfriado em BTS, 10 μ l de Diacetato de Carboxifluoresceína (20mM), 5 μ L de Iodeto de Propídio (7,3mM) e 10 μ l de paraformaldeído (1,7mM) foi incubada por 8 minutos a 30°C em banho-maria. Após este período de incubação, foi examinada uma alíquota de 4 μ l, entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (filtro EX/DM/BF= 450-490/510/520nm), em aumento de 1000x. Foram avaliadas 300 células espermáticas, em cada amostra. Os espermatozoides foram classificados conforme ORTMAN & RODRIGUEZ-MARTINEZ (1994), sendo considerados com membranas íntegras aqueles integralmente corados em verde.

As variáveis submetidas à análise estatística foram MOT, ACN e MI. A análise da MOT e MI foi

efetuada com o procedimento MIXED (SAS, 1999) para análises repetidas no tempo (diferentes momentos de avaliação da mesma amostra de sêmen), utilizando a função auto-regressiva como opção de estrutura de covariância. No modelo, foram incluídos os efeitos dos tratamentos, da data de coleta, dos machos, do momento de avaliação das amostras da interação dos tratamentos com a data de coleta, dos tratamentos com os machos e dos tratamentos com o momento de avaliação das amostras de sêmen. As médias foram calculadas pela opção LSMeans, sendo comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. O ACN foi avaliado como medida repetida no tempo, no experimento I, mas no experimento II, por haver uma única avaliação, foi utilizado o procedimento GLM (SAS, 1999). Para todas as variáveis, quando um dos fatores ou sua interação não foram significativos, os mesmos foram retirados do modelo de análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo da interação entre macho e tratamento ($P>0,05$), mas houve efeito do macho nos percentuais de MOT, MI e ACN, o qual foi mantido no modelo estatístico. As variações de 59 a 68% e de 70 a 77%, nos percentuais de motilidade e de membranas íntegras, respectivamente, nas 120h de armazenamento, no sêmen armazenado a 17°C, observadas no presente estudo (Tabelas 2 e 3), são semelhantes às relatadas por outros autores (BALTES, 1993; SATHER et al., 1991; SCHEID et al., 1993; WABERSKI et al., 1994). Não houve efeito da interação entre tratamento e momento de avaliação, na variável MOT, no experimento I, mas essa interação foi significativa ($P<0,05$) no experimento II. O percentual de MOT foi superior ($P<0,05$) para o sêmen armazenado a 17°C em comparação a 5°C, em todas as avaliações, no experimento I e, a partir de 72h de armazenamento, no experimento II (Tabela 2). Houve efeito ($P<0,05$) da interação entre tratamento e momento de avaliação, na variável MI, em ambos os experimentos. No experimento I, nas 48h, a MI do sêmen armazenado a 5°C, após queda lenta de temperatura, foi inferior ($P<0,05$) à observada para o sêmen incubado e armazenado a 5°C e àquele armazenado a 17°C, enquanto no experimento II a MI foi similar ($P>0,05$) entre os tratamentos. A partir das 72h, a MI foi superior ($P<0,05$), para o sêmen mantido a 17°C (Tabela 3), em comparação ao mantido a 5°C, em ambos os experimentos. Não houve efeito ($P<0,05$) da interação entre tratamento e momento de avaliação, na variável ACN, no experimento I. Não houve

diferença ($P>0,05$) nos percentuais de acrossomas normais, em nenhum dos momentos de avaliação, em ambos os experimentos. Os valores observados, nas 120h de armazenamento, foram $81,6 \pm 6,6\%$, $79,1 \pm 9,0\%$ e $79,2 \pm 8,8\%$ para T1, T2 e T3, respectivamente, no experimento I, e $78,6 \pm 14,7\%$, $76,5 \pm 11,6\%$, $79,5 \pm 10,5\%$ e $78,1 \pm 11,8\%$ para T1, T2, T3 e T4, respectivamente, no experimento II.

Embora se saiba que um resfriamento mais rápido implica maiores prejuízos aos espermatozoides, ainda não está bem definida qual é a velocidade de resfriamento adequada para o armazenamento do sêmen suíno em temperaturas abaixo de 15°C. No experimento I, o armazenamento a 5°C após queda lenta de temperatura, com a taxa de resfriamento de $0,07^\circ\text{C h}^{-1}$ (queda de 6°C na primeira hora; Tabela 1), resultou em índices de motilidade, de membranas íntegras e de acrossomas normais semelhantes aos observados para o sêmen incubado previamente (Tabelas 2 e 3) e superiores aos observados com resfriamento rápido por outros autores (WEBER, 1989; KATZER, 2002). Os resultados reforçam as observações de que um resfriamento lento ameniza os efeitos deletérios do choque térmico pelo frio. De acordo com WATSON & PLUMMER (1985), a velocidade de resfriamento influencia decisivamente no efeito do choque térmico sobre os espermatozoides. WEITZE et al. (2000) obtiveram maiores índices de MOT e ACN quando utilizaram resfriamento lento ou gradual em comparação ao resfriamento rápido. KOTZIAS-BANDEIRA (1999) também observou efeito benéfico do resfriamento lento, na MOT e ACN, em comparação à colocação direta das amostras a 5°C. WEBER (1989) obteve índices de MOT inferiores a 20%, nas 48h, quando armazenou sêmen diretamente a 5°C. Provavelmente, os baixos índices observados por WEBER (1989), logo após o sêmen ter atingido a temperatura de 5°C, deve-se ao fato das amostras terem sido submetidas à velocidade rápida de resfriamento. O valor de 43% de motilidade, nas 48h de armazenamento, observado por KATZER (2002), quando colocou sêmen suíno diretamente a 5°C também seria inaceitável para seu uso na inseminação. Este valor pode ter resultado da rápida velocidade de resfriamento utilizada ($0,24^\circ\text{C/h}$), com queda de $13,3^\circ\text{C}$ na primeira hora de resfriamento.

A metodologia empregada para submeter as doses de sêmen a uma queda lenta de temperatura, no presente estudo, embora de fácil aplicabilidade, exigiu cuidados para evitar uma possível entrada de água em alguma das doses que porventura não estivesse bem fechada; além disto, foi necessário manter sempre o mesmo volume de água, envolvendo cada dose, de

Tabela 1 - Velocidade de queda da temperatura (°C/min) das curvas de resfriamento.

Curvas	°C/min				
	0-1h	1-2h	2-3h*	3-7h*	7-11h*
Curva 1 – de 22°C a 17°C	0,060	0,017	-	-	-
Curva 2 – de 22°C a 5°C (incubação de 24h a 17°C)	0,060	0,017	0,160	0,038	
Curva 3 – de 22°C a 5°C (queda lenta)**	0,077	0,043	0,033	0,019	0,007

* Considerado como se queda fosse contínua, sem período de 24h de incubação a 17°C.

** Obtida pela colocação da dose de sêmen em caixa de isopor contendo 1000 ml de água a 20°C, a qual foi armazenada em incubadora a 5°C.

A curva 1 foi usada para T1 (experimento I), T1 e T3 (experimento II); a curva 2 foi usada para T2 (experimento I), T2 e T4 (experimento II); curva 3 usada para T3 (experimento I).

Tabela 2 - Percentuais de motilidade (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno resfriado em BTS.

Experimento	Tratamento	n	Momento de avaliação (horas)			
			48	72	96	120
I	T1	30	75,7 ± 7,8 ^a	74,4 ± 4,7 ^a	70,6 ± 6,0 ^a	67,6 ± 6,9 ^a
	T2	30	65,7 ± 7,4 ^b	65,6 ± 6,8 ^b	60,9 ± 9,3 ^b	56,1 ± 10,0 ^b
	T3	30	62,6 ± 6,8 ^b	62,8 ± 8,1 ^b	56,1 ± 10,7 ^b	49,4 ± 11,6 ^b
II	T1	24	73,4 ± 12,1 ^c	69,0 ± 12,0 ^c	65,0 ± 13,4 ^c	58,6 ± 17,8 ^c
	T2	24	63,4 ± 15,9 ^c	52,0 ± 15,7 ^d	49,0 ± 22,4 ^d	42,2 ± 23,3 ^d
	T3	24	77,2 ± 10,4 ^c	71,3 ± 13,4 ^c	66,5 ± 15,2 ^c	62,2 ± 10,5 ^c
	T4	24	63,6 ± 14,4 ^c	54,5 ± 16,2 ^d	50,9 ± 18,6 ^d	42,7 ± 22,1 ^d

a, b na mesma coluna, no experimento I, indicam diferença significativa (P<0,05).

c, d na mesma coluna, no experimento II, indicam diferença significativa (P<0,05).

T1= 120h a 17°C e T2= 24h a 17°C + 96h a 5°C (Experimentos I e II).

T3= 120h a 5°C com queda lenta de temperatura (Experimento I).

T3= 8h a 22°C + 112h a 17°C, e T4= 8h a 22°C + 16h a 17°C+ 96h a 5°C (Experimento II).

Tabela 3 - Percentuais de membranas íntegras (média ± desvio-padrão) de sêmen suíno resfriado em BTS

Experimento	Tratamento	n	Momento de avaliação (horas)			
			48	72	96	120
I	T1	30	73,1 ± 12,0 ^a	76,6 ± 6,0 ^a	76,7 ± 7,0 ^a	76,8 ± 8,0 ^a
	T2	30	68,8 ± 8,5 ^a	67,7 ± 7,9 ^b	64,8 ± 8,0 ^b	61,9 ± 9,5 ^b
	T3	30	66,0 ± 6,0 ^b	64,9 ± 9,2 ^b	63,8 ± 8,1 ^b	60,8 ± 8,0 ^b
II	T1	24	73,8 ± 8,3 ^c	71,5 ± 11,3 ^c	72,9 ± 10,6 ^c	70,1 ± 13,5 ^c
	T2	24	66,8 ± 9,7 ^c	59,1 ± 10,5 ^d	55,6 ± 12,2 ^d	59,0 ± 12,9 ^d
	T3	24	74,9 ± 7,0 ^c	74,1 ± 9,8 ^c	72,0 ± 11,2 ^c	69,7 ± 11,2 ^c
	T4	24	68,3 ± 5,2 ^c	61,2 ± 12,6 ^d	60,5 ± 12,6 ^d	59,1 ± 13,9 ^d

a, b na mesma coluna, no experimento I, indicam diferença significativa (P<0,05).

c, d na mesma coluna, no experimento II, indicam diferença significativa (P<0,05).

T1= 120h a 17°C, e T2= 24h a 17°C + 96h a 5°C (Experimentos I e II).

T3= 120h a 5°C com queda lenta de temperatura (Experimento I).

T3= 8h a 22°C + 112h a 17°C, e T4= 8h a 22°C + 16h a 17°C+ 96h a 5°C (Experimento II).

modo a evitar a variação na queda de temperatura. No entanto, essa prática permitiu a utilização de apenas uma incubadora de sêmen, mantida a 5°C, diferentemente do procedimento de incubação prévia

do sêmen, o qual exigiu uma incubadora de sêmen mantida a 17°C e outra a 5°C.

Vários autores demonstraram que os espermatozoides aumentam sua resistência ao choque

térmico quando incubados por certo período, em temperaturas acima de 15°C (PURSEL et al., 1972ab/1973ab; TAMULI & WATSON, 1994; MAXWELL & JOHNSON, 1997). Em ambos os experimentos, índices de motilidade superiores a 60% foram observados nas 48h de armazenamento, em todas as amostras de sêmen submetidas a um período de incubação, antes de serem armazenadas a 5°C (Tabela 2). PURSEL et al. (1973b) constataram que períodos de incubação de 3,5 e 6,5h a 24-26°C resultaram em maiores índices de MOT e ACN do que 0,5h de incubação, para o sêmen armazenado por 120h a 5°C. WEBER (1989) avaliou o efeito de diferentes temperaturas (25, 20 e 15°C) e períodos (0, 4, 8 e 24h) de incubação, antes do resfriamento a 5°C, tendo o sêmen incubado por 24h apresentado índices de motilidade entre 60 e 70%, não diferindo para as temperaturas de incubação, mas sendo superiores aos períodos de 4 e 8h de incubação. PÉREZ-LLANO & GARCIA-CASADO (2003) observaram maior percentual de motilidade e de acrossomas normais no sêmen incubado a 15°C antes de ser armazenado a 5°C, em comparação ao sêmen sem incubação prévia. Esses autores constataram que 3h de incubação não foram suficientes para amenizar os efeitos deletérios do choque térmico, sendo necessárias 12 a 24h de incubação prévia, para o sêmen armazenado a 5°C.

No experimento II, no qual foram testados diferentes períodos e temperaturas de incubação, foi verificado que não há diferença entre efetuar a incubação por 24h a 17°C ou associar um período de 8h a 22°C com 16h a 17°C, antes do armazenamento a 5°C (Tabelas 2 e 3). Isto mostra que um período de incubação em temperatura superior a 17°C não é necessário, o que facilitaria a incubação antes do armazenamento a 5°C, pois a mesma seria efetuada em apenas uma etapa de 24h.

Também foi constatado, no experimento II, que os percentuais de MOT e MI, do sêmen armazenado a 17°C, não foram influenciados pelo tempo de permanência a 22°C, por um período de 2 ou 8h (Tabelas 2 e 3). Esta observação indica que é possível manter o sêmen suíno por um período superior ao de 90 minutos, normalmente recomendado para seu equilíbrio, em temperatura ambiente (20 a 24°C), antes do resfriamento a 15-18°C. Não haveria, assim, a necessidade de seguir tão rigorosamente o período de 90 minutos podendo, inclusive, ser benéfico para o envio de doses até a propriedade, o qual pode ser efetuado durante esse período, antes que o sêmen seja submetido à temperatura final de armazenamento.

No presente estudo, os menores índices de MOT e MI do sêmen mantido a 5°C, em comparação

àquele mantido a 17°C, mostram que, mesmo com queda lenta de temperatura ou incubação prévia, ainda devem ter ocorrido perturbações de permeabilidade de membrana e desequilíbrio iônico intra e extracelular (DE LEEUW et al., 1990/1991) que, conforme WATSON (1996), podem reduzir a viabilidade espermática.

CONCLUSÕES

O sêmen suíno pode ser mantido a 22°C por 2 ou 8h, antes de ser armazenado a 17°C. No sêmen armazenado a 5°C, viabilidade espermática semelhante é obtida com utilização de curva lenta de resfriamento, incubação prévia de 24h a 17°C ou incubação prévia por 8h a 22°C mais 16h a 17°C. O resfriamento a 5°C ainda precisa ser otimizado para obter viabilidade espermática semelhante à observada com o armazenamento a 17°C. Os índices de viabilidade espermática obtidos não permitem recomendar o uso de sêmen armazenado a 5°C, em diluente BTS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALTES, T.J. **Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of *in vitro* aging of boar spermatozoa.** 1993. 120f. Tese (Doutorado em Reprodução de Suínos) - Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha.
- BUHR, M.M. et al. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.31, p.224-238, 1994.
- DE LEEUW, F.E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-183, 1990.
- DE LEEUW, F.E. et al. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1, p.95-104, 1991.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. Insemination before and after the onset of heat in sows. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- KATZER, L.H. **Resfriamento de sêmen suíno: efeito da temperatura de armazenamento, incubação prévia, taxa de resfriamento e diluentes.** 2002. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Reprodução de Suínos) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- KOTZIAS-BANDEIRA, E. Influência de diferentes diluentes e temperaturas de refrigeração sobre a qualidade de sêmen suíno. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.36, n.4, p.194-198. 1999.

- LANDSVERK, K. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville, Maryland, USA. **Proceedings...** Lawrence : Allen, 2000. 280p. p.137-139.
- LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., Beltsville, Maryland USA. **Proceedings...** Lawrence : Allen, 2000. p.121-128.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.209-219, 1997.
- ORTMAN, K.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47, 1994.
- PÉREZ-LLANO, B.; GARCIA-CASADO, P. Influence of incubation time on quality of boar semen preserved at 5°C. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 5., 2003, Doorwerth, Holanda. **Proceedings...** Utrecht : Utrecht University. 2003. p.77.
- PURSEL, V.G. et al. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, n.2, p.278-283, 1972a.
- PURSEL, V.G. et al. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.35, n.3, p.580-584, 1972b.
- PURSEL, V.G. et al. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.2, n.2, p.528-531, 1973a.
- PURSEL, V.G. et al. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5°C. **Journal of Animal Science**, v.37, n.3, p.785-789, 1973b.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 8. Cary, 1999. 1464p.
- SATHER, A.P. et al. A note on the influence of storage duration of fresh semen on fertilizing capacity and embryo survival in sows. **Animal Production**, v.52, p.554-557, 1991.
- SCHEID, I. et al. Comparação entre diluentes para conservação de sêmen suíno no estado líquido: resultados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6., 1993, Goiânia, GO. **Anais...** Concórdia : EMBRAPA, 1993. p.122.
- TAMULI, M.K., WATSON, P.F. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. **Veterinary Record**, v.135, n.7, p.160-162, 1994.
- WABERSKI, D. et al. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v.41, p.1367-1377, 1994.
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.1, p.135-140, 1996.
- WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala : Swedish University of Agriculture Sciences, 1985. 310p. p.113-127.
- WEBER, H. **Zur Kälteschockempfindlichkeit von Eberspermien; Einflub von Verdünnermedium, Inkubation und Abkühlrate**. 1989. 103f. Tese (Doutorado em Reprodução de Suínos) - Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha.
- WEITZE, K.F. The use of "long-term extender" in pig AI- a view of the international situation. **Pig News and Information**, v.11, n.1, p.23- 26, 1990.
- WEITZE, K.F. et al. Influence of incubation time and cooling rate on chilling sensitivity of diluted boar semen. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 1999, Beltsville, Maryland, USA. **Proceedings...** Lawrence : Allen, 2000. 280p. p.264.
- WOELDERS, H. Overview of in methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1. p.145-164. 1991.