

INCUBAÇÃO E CONSERVAÇÃO: EFEITO SOBRE A MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN SUÍNO

(Incubation and conservation: effect on sperm motility of swine semen)

Ricardo TONIOLLI*; Tatyane Bandeira BARROS; Luciana de Souza TONIOLLI;
Ludymila Furtado CANTANHÊDE; Daianny Barboza GUIMARÃES;
Aline Viana DIAS; Lina Raquel Santos ARAÚJO

Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (FAVET/UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza/Ce, CEP: 60.740-000. *E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

Visando aumentar a resistência espermática ao abaixamento de temperatura, foram utilizados ejaculados de três reprodutores coletados pela técnica da mão enluvada. Após a coleta, uma alíquota de sêmen foi diluída em BTS e distribuída, em partes iguais, em cinco tratamentos que diferiam entre si quanto às temperaturas (37 e 25 °C) e aos tempos de equilíbrio (6 e 24 horas) antes da conservação a 17 °C por sete dias. Os tratamentos foram: T1: sêmen sem nenhum tempo ou temperatura de equilíbrio; T2 e T3: sêmen incubado a 37 °C por 6 e 24 horas., respectivamente; T4 e T5: sêmen incubado a 25 °C por 6 e 24 horas., respectivamente. O sêmen foi avaliado nos dias D1 a D4 e no D7 quanto ao vigor e motilidade espermática aos cinco minutos, e duas horas após reaquecimento a 37 °C. O sêmen incubado a 37 °C/24 horas apresentou valores de vigor e motilidade muito inferiores aos dos demais tratamentos ($p < 0,05$), enquanto o sêmen submetido à temperatura de equilíbrio de 25 °C por 6 horas anteriores à diluição destacou-se ao conservar a motilidade espermática após duas horas de incubação a 37 °C ($p < 0,05$). Concluiu-se que as diferentes temperaturas e tempos de equilíbrio utilizadas, influenciaram na conservação do sêmen. A temperatura de incubação mais elevada (37 °C) na pré-diluição, por período prolongado (24 horas), reduziu a resistência espermática ao abaixamento da temperatura. Já, a combinação temperatura/tempo de 25 °C/6 horas, favoreceu a manutenção da motilidade espermática em teste de termorresistência.

Palavras-chave: Varrão, choque térmico, espermatozoide, ejaculado.

ABSTRACT

Aiming to increase the spermatic resistance to lowering of temperature, ejaculates from three boars collected through the technique of the glove hand were used. After collection, an aliquot of semen was diluted in the BTS and distributed, in equal parts, in 5 treatments that differed in terms of temperatures (37 and 25 °C) and balance period (6 and 24 hours) before conservation at 17 °C for 7 days. The treatments were: T1: semen not subjected to any time or equilibrium temperature; T2 and T3: semen incubated at 37 °C for 6 and 24 hours, respectively; T4 and T5: semen incubated at 25 °C for 6 and 24 hours, respectively. The semen was evaluated on days D1 to D4 and on D7 for vigor and sperm motility at five minutes, and two hours after rewarming at 37 °C. The semen incubated at 37 °C/24 hours presented values of vigor and motility much lower than those of the other treatments ($p < 0.05$, while the semen submitted to the equilibrium temperature of 25 °C for 6 hours prior to dilution stood out by conserving sperm motility after 2 hours of incubation at 37 °C ($p < 0.05$). In conclusion, the different temperatures and times of equilibrium used influenced the semen conservation, in which a higher pre-dilution incubation temperature (37 °C) for a prolonged period (24 hours) reduced the sperm resistance to a lowering of temperature, while the combination 25 °C/6 hours favored the maintenance of sperm motility in a thermoresistance test.

Keywords: Boar, thermic shock, sperm, ejaculate.

INTRODUÇÃO

Uma das formas de aumentar a difusão do sêmen de animais geneticamente superiores é através da utilização de tecnologias reprodutivas que permitem acelerar o ganho

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

genético, como é o caso da difusão genética via doses de sêmen. A aquisição de doses de sêmen via Centrais de Inseminação Artificial especializadas é uma tendência mundial que já está amplamente difundida entre os principais países produtores de carne suína (ALKMIN, 2019) Contudo, a utilização da IA nessa espécie animal está limitada à uma conservação do sêmen, em média de 72 horas entre 15 a 18 °C, com diluentes convencionais (SINGH *et al.*, 2019).

A sensibilidade dos espermatozoides de mamíferos ao choque térmico varia com as espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2018; PALAZÓN e CERVERA, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019; TONIOLLI e CANTANHÊDE, 2019). Sabe-se que os espermatozoides suínos são extremamente sensíveis ao choque térmico. Isso acontece quando o sêmen *in natura* é diluído e resfriado bruscamente, principalmente em temperaturas abaixo de 15 °C, com perda da viabilidade espermática (KATZER, 2009; SINGH *et al.*, 2019). Essa sensibilidade ao choque térmico é caracterizada por uma perda irreversível da permeabilidade seletiva e da integridade da membrana plasmática do espermatozoide, levando a célula à morte (BAJUK *et al.*, 2020).

Diversos diluentes, têm sido utilizados na conservação do sêmen suíno, entretanto, a célula espermática ainda tem uma sobrevivência limitada (JOFRÉ *et al.*, 2019). Para se garantir um efeito protetor, o sêmen deve ser diluído em soluções que contenham nutrientes (BRESCIANI *et al.*, 2017), antioxidantes (JOFRÉ *et al.*, 2019), antibióticos (BRYLA e TRZCIŃSKA, 2015) e substâncias crioprotetoras, assim os espermatozoides suportam melhor baixas temperaturas e continuam viáveis por um tempo mais prolongado (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Já foi demonstrado que os espermatozoides adquirem uma resistência gradual ao choque térmico quando incubados por certos períodos, em temperaturas acima de 15 °C, apresentando melhor motilidade e integridade acrossomal (SILVA *et al.*, 2014; TONIOLLI *et al.*, 2018). Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo testar diferentes temperaturas e tempos de equilíbrio para o espermatozoide suíno, visando o aumento da resistência espermática ao abaixamento de temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

Os animais utilizados para o estudo foram provenientes do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, eram adultos e tinham idades entre 12 e 24 meses, encontrando-se em sistema rotineiro de coletas. Antes de cada coleta, foi realizada uma higienização externa do prepúcio com sabão neutro e água tratada, e secagem da região com papel toalha descartável. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 20 de maio de 2011, segundo processo registrado sob o nº 10.724.796-8/11 (CEUA – UECE).

Um total de três reprodutores híbridos (Dalland) foram submetidos à coleta de sêmen uma vez por semana durante dez semanas (n=30), pela técnica da mão enluvada, sendo as amostras coletadas em recipiente com capacidade para 500mL, coberto por uma gaze e protegido por envoltório térmico. A fração gelatinosa, retida pela gaze, foi desprezada e foi aproveitado o ejaculado total.

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

Após a coleta, o sêmen foi levado ao laboratório, para verificação do volume (mL), medido em balança digital, da concentração ($\times 10^6$ spz/mL) avaliada pelo espectrofotômetro (MINITUB) e do total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz). O vigor espermático (0 a 5) e a motilidade espermática (0 a 100%), foram avaliados através da microscopia óptica, com uma amostra de sêmen (15 μ L) colocada entre lâmina e lamínula, levada ao microscópio em um aumento de 200 vezes. Eram aproveitados apenas os ejaculados com valores mínimos de vigor $\geq 3,0$ e de motilidade $\geq 70\%$.

Processamento do ejaculado e tratamentos experimentais

Foi utilizado o diluente comercial *Beltsville Thawing Solution* (BTS – WEITZE, 1991) para a diluição do sêmen. Nos tratamentos com incubação prévia, o ejaculado *in natura* foi inicialmente fracionado, utilizando-se um total de $4,375 \times 10^6$ spz, distribuído em cinco tubos falcon (Prolab - 1tubo/tratamento e 875×10^6 spz/tubo), em um volume de 25mL e incubado por 15 minutos em duas temperaturas (37 e 25 °C). O volume de cada tubo falcon, foi dividido entre cinco tubos de ensaio com capacidade de 5mL (5 tratamentos x 5 dias de conservação x 5mL/tubo), contendo 175×10^6 spz/tubo.

Ao final desse tempo, o sêmen era pré-diluído em BTS na proporção de duas partes de diluente para uma de sêmen (2:1); posteriormente, volumes iguais eram fracionados em tubos de ensaio com capacidade para 10mL e em seguida incubados nos diferentes tempos de equilíbrio do sêmen (6 e 24 horas). Após passar os respectivos tempos de equilíbrio, o volume de cada tubo em cada tratamento foi completado com o diluente BTS até o total de 5mL, respeitando-se a concentração de 35×10^6 spz/mL (em todos os tratamentos) em cada tubo de ensaio. Em seguida, eram mantidos em geladeira a 17 °C durante sete dias. O sêmen destinado ao controle, não passava por esses procedimentos, sendo, logo após a coleta, diluído a 37 °C no diluente BTS e em seguida levado à conservadora (geladeira) de sêmen a 17 °C por sete dias.

Foram utilizadas duas temperaturas de incubação (37 e 25 °C) e dois tempos de equilíbrio (6 e 24 horas), dividindo o ejaculado em cinco tratamentos, sendo eles:

T1 = sêmen *in natura* diluído a 37 °C + conservação a 17 °C por sete dias (controle);

T2 = sêmen *in natura* diluído e incubado a 37 °C/15' + BTS (2:1) + incubação/equilíbrio a 37 °C/6 horas + completa volume c/BTS a 37 °C + conservação a 17 °C por sete dias;

T3 = sêmen *in natura* diluído e incubado a 37 °C/15' + BTS (2:1) + incubação/equilíbrio a 37 °C/24 horas + completa volume c/BTS a 37 °C + conservação a 17 °C por sete dias;

T4 = sêmen *in natura* diluído e incubado a 25 °C/15' + BTS (2:1) + incubação/equilíbrio a 25 °C/6 horas + completa volume c/BTS a 25 °C + conservação a 17 °C por sete dias;

T5 = sêmen *in natura* diluído e incubado a 25 °C/15' + BTS (2:1) + incubação/equilíbrio a 25 °C/24 horas + completa volume c/BTS a 25 °C + conservação a 17 °C por sete dias.

Avaliação do sêmen durante a conservação

O sêmen foi conservado durante um período de sete dias à temperatura de 17 °C. As análises foram feitas em cinco diferentes dias (D1, D2, D3, D4, D7). Para cada dia de avaliação do sêmen, uma sequência de tubos de ensaio (cada ejaculado dentro de cada

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

temperatura e tempo de equilíbrio) foi colocada em banho-maria a 37 °C para posterior avaliação. As análises das características vigor e motilidade espermática, foram feitas após cinco minutos e duas horas de incubação do sêmen a 37 °C, com uma gota (0,15µL) do sêmen diluído entre lâmina e lamínula e analisada ao microscópio óptico em um aumento de 200 vezes, conforme descrito acima para o ejaculado *in natura*.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. Para análise da normalidade dos dados, foi feito o teste de Shapiro Wilk e, em seguida, os dados foram submetidos aos testes de Mann Whitney e Teste do Qui-quadrado modificado, das variáveis não paramétricas e paramétricas, respectivamente. Foram obtidas médias e desvios padrões de cada grupo e a análise estatística das diferenças foi realizada através do programa *Bioestat* 5.0., com um índice de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo período de incubação do sêmen e nos dois tempos de incubação e pré-análise (5 minutos e 2 horas), o vigor e a motilidade espermática, no T3, apresentaram os valores mais baixos ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos (Figs. 01 a 04), evidenciando um efeito deletério da temperatura mais alta (37 °C) associada a um tempo de equilíbrio prolongado (24 horas). Quando comparado com o resultado do T2, no qual foi utilizada a mesma temperatura e um período de equilíbrio de tempo quatro vezes menor (6 horas), os resultados foram significativamente melhores ($p < 0,05$). Isso indica que foi possível o uso de uma temperatura alta (37 °C) para a incubação do sêmen, à condição do período de incubação não ser longo, evitando resultados abaixo do mínimo desejado para ser considerado como um sêmen viável e com boa possibilidade de fertilização. Nesse sentido, essa pode ser uma temperatura a ser considerada para o banho-maria de recepção e para manter o sêmen no período após a coleta durante as análises, sem prejuízos à qualidade do sêmen.

Kotzias-Bandeira (1999) é favorável à utilização de um longo período de incubação (≥ 24 horas) do sêmen, visando obter um aumento da resistência do espermatozoide ao choque térmico. Os resultados deste trabalho indicaram claramente que esse tipo de prática é possível de ser realizada, entretanto, desde que a temperatura de incubação do sêmen esteja alguns graus abaixo de 39 °C, evitando queda acentuada da motilidade e do vigor espermático. Segundo o mesmo autor, temperaturas baixas (15 °C), utilizadas para incubação do sêmen, também provocam perda de cerca de 20% de motilidade em relação ao sêmen incubado a 35 °C por três horas. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho no T2, apesar do tempo de incubação utilizado ter sido o dobro (6 horas). Assim sendo, espera-se que temperaturas intermediárias à corporal e à de conservação normal do sêmen, devam proporcionar resultados melhores de qualidade da motilidade espermática.

Em outro trabalho, com duas temperaturas diferentes (30 e 25 °C) por um período de quatro horas antes do sêmen ser colocado a 17 °C, não foram observadas melhorias no vigor espermático em relação ao sêmen diluído a 30 °C e armazenado a 17 °C sem incubação prévia

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

(TONIOLLI *et al.*, 2018). Já neste estudo, observou-se que o vigor espermático pode ser mantido utilizando-se um tempo de equilíbrio maior (6 ou 24 horas) a 25 °C.

Os baixos resultados apresentados no T3 podem ser explicados por uma maior taxa de metabolismo em altas temperaturas (37 °C) associada a um longo tempo de equilíbrio (24 horas), que exige um maior consumo de energia pela célula, favorecendo um maior desgaste e um “envelhecimento” precoce dos espermatozoides (PEZO *et al.*, 2019), comprometendo sua motilidade. Temperaturas medianas (± 20 °C) associadas a períodos de equilíbrio entre quatro e 16 horas proporcionariam maiores taxas de sobrevivência espermática após o sêmen ter sido submetido a um choque térmico (WATSON, 1981), fato este comprovado pela resultados do tratamento T4, particularmente quando o sêmen foi incubado por seis horas. Entretanto, uma variação entre temperatura alta com tempo de equilíbrio curto (37 °C e 6h), ou temperatura baixa com tempo de equilíbrio longo (25 °C e 24h), particularmente após as duas horas de incubação do sêmen, proporcionaram também resultados semelhantes. Assim sendo, faz-se necessário trabalhos adicionais onde se possa testar uma maior gama de combinações entre temperatura e tempo na incubação do sêmen.

Analisando os resultados do vigor espermático, percebeu-se que aos cinco minutos de incubação o T1 (controle), apesar de não apresentar diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos outros (exceto T3), manteve seus valores médios durante todo o período de conservação do sêmen, em patamares mais baixos, demonstrando, dessa forma, uma presente, mas fraca ação da incubação do sêmen sobre essa característica (Fig. 01). Entretanto, a diluição do sêmen em temperaturas mais baixas e posterior resfriamento a 17 °C ainda é prática usual e garante bons resultados *in vivo* (ALEXIOU *et al.*, 2017). Estes autores, Alexiou *et al.*, 2017) observaram a manutenção de características *in vitro* em sêmen diluído a 23 e 30 °C e conservado entre 16 e 18 °C por até 72 horas, com o sêmen diluído a 30 °C apresentando resultados melhores *in vivo*, e uma melhor taxa de parição.

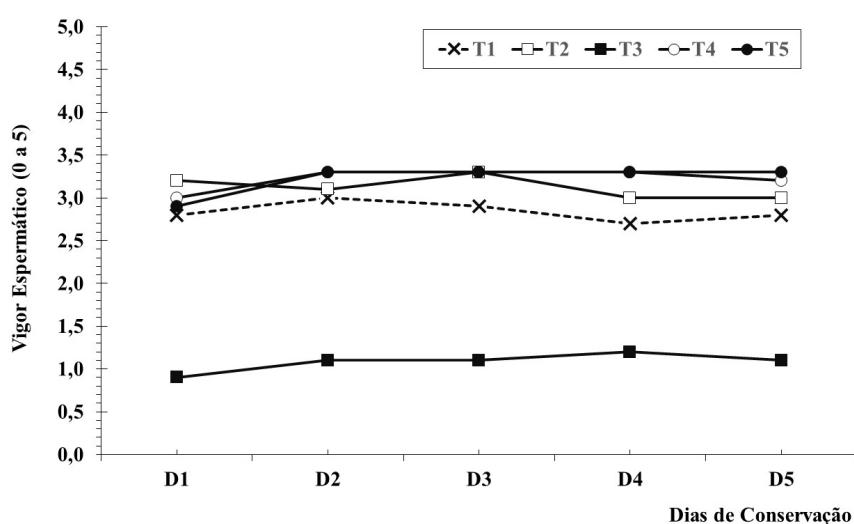


Figura 01: Valores médios do vigor espermático (0 a 5) em diferentes tratamentos, do sêmen suíno conservado por sete dias a 17 °C, após cinco minutos de reaquecimento a 37 °C.

Obs.: T1 (controle) = diluído a 37 °C → 17 °C (7 dias); T2= 37 °C/ 6 horas → 17 °C (7 dias); T3= 37 °C/24 horas → 17 °C (7 dias); T4= 25 °C/6 horas → 17 °C (7 dias); T5= 25 °C/ 24 horas → 17 °C (7 dias).

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

Após as duas horas de incubação, os valores do vigor espermático, em todos os tratamentos (exceto T3), se aproximaram ainda mais, durante todo o período de conservação do sêmen. Entre o início (5 minutos) e o final da incubação (2 horas), houve uma queda de 1 ponto, nos valores do vigor (Fig. 02). Essa queda pode estar relacionada à perda da integridade de membrana espermática durante a incubação. Segundo Peixoto *et al.* (2017), o vigor espermático e a integridade da membrana plasmática apresentam correlação positiva moderada. Nesse sentido, conforme observado por Pavaneli *et al.* (2017), a incubação do sêmen a 37 °C por duas horas faz com que o percentual de células espermáticas com membrana plasmática íntegra caia quando comparado à leitura após dez minutos de incubação, interferindo negativamente na manutenção do vigor espermático.

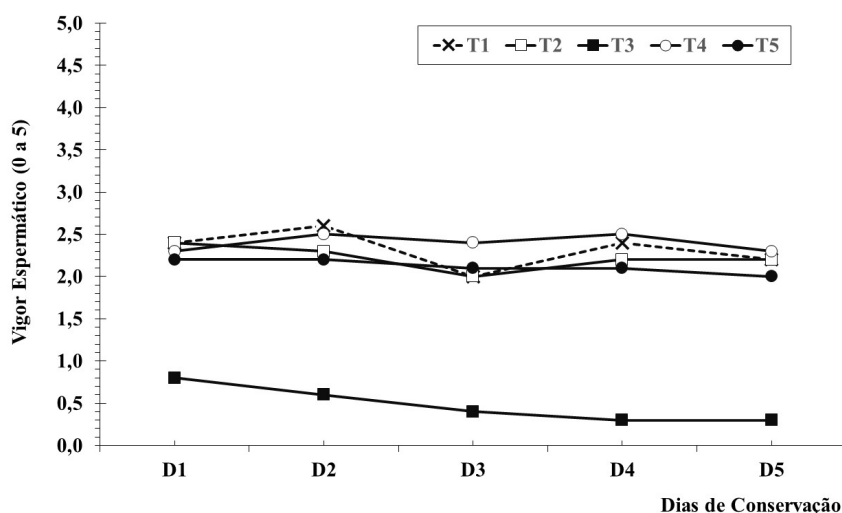


Figura 02: Valores médios do vigor espermático (0 a 5) em diferentes tratamentos, do sêmen suíno conservado por 7 dias a 17 °C, após 2 horas de reaquecimento a 37 °C.

Obs.: T1 (controle) = diluído a 37 °C → 17 °C (7 dias); T2= 37 °C/ 6h → 17 °C (7 dias); T3= 37 °C/24h → 17 °C (7 dias); T4= 25 °C/6h → 17 °C (7 dias); T5= 25 °C/ 24 h → 17 °C (7 dias).

Para a característica motilidade espermática (5 minutos de incubação), entre os resultados de T2, T4 e T5, com tempo de equilíbrio, não houve diferenças significativas ($p>0,05$), não sendo evidenciada ação entre as diferentes combinações de temperatura e tempo de equilíbrio. Por outro lado, os resultados obtidos no T1, apresentaram valores baixos ($p<0,05$) durante todo o período de conservação do sêmen (Fig. 03), devido, provavelmente, à falta de incubação prévia, comprovando assim a alta sensibilidade do sêmen suíno ao choque térmico. Isso poderia ter sido minimizado, melhorando a resistência espermática, através de uma pré-incubação desse ejaculado (LUONGO *et al.*, 2019). Os resultados do presente estudo, corroboraram com os resultados de Luongo *et al.* (2019), principalmente pelos valores motilidade espermática, ficando bem clara a ação da incubação prévia do sêmen, antes do período de conservação a 17 °C.

Foram observados valores mais baixos de motilidade espermática em T3 (longo período de equilíbrio a 37 °C), provavelmente causados pelos mesmos motivos que causaram redução nos valores de vigor. A elevada temperatura de equilíbrio foi responsável por uma maior taxa de metabolismo das células, com maior consumo de energia e geração de espécies

reativas ao oxigênio, favorecendo um desgaste precoce dos espermatozoides (PEZO *et al.*, 2019).

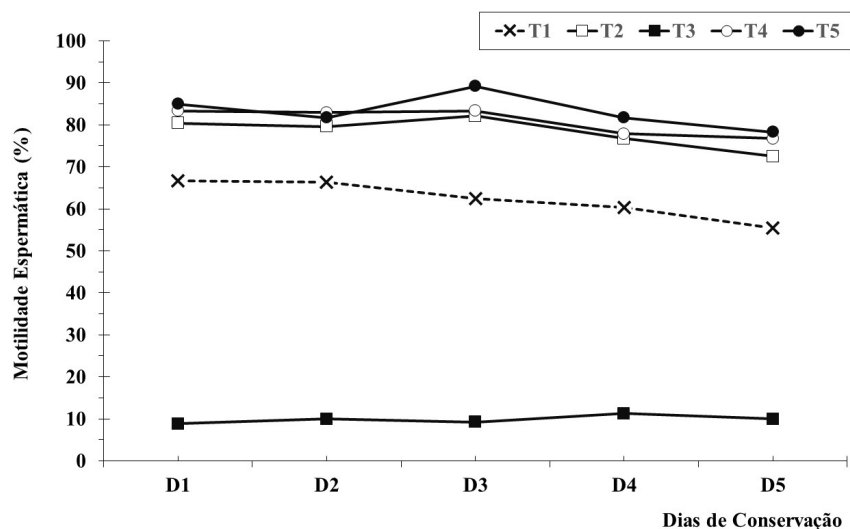


Figura 03: Valores médios da motilidade espermática (%), em diferentes tratamentos, do sêmen suíno conservado por 7 dias a 17 °C, após 5 minutos de reaquecimento a 37 °C.

Obs.: T1 (controle) = diluído a 37 °C → 17 °C (7 dias); T2= 37 °C/ 6h → 17 °C (7 dias); T3= 37 °C/24h → 17 °C (7 dias); T4= 25 °C/6h → 17 °C (7 dias); T5= 25 °C/ 24 h → 17 °C (7 dias).

Após as duas horas de incubação a 37 °C, apenas em T4 (menor temperatura e tempo de equilíbrio), a partir do segundo dia de conservação (D2), o sêmen conseguiu manter maiores valores de motilidade espermática ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Esse resultado vai ao encontro da literatura (TONIOLLI *et al.*, 2018), indicando a possibilidade de resultados melhores com a utilização do ejaculado assim tratado (Fig. 04).

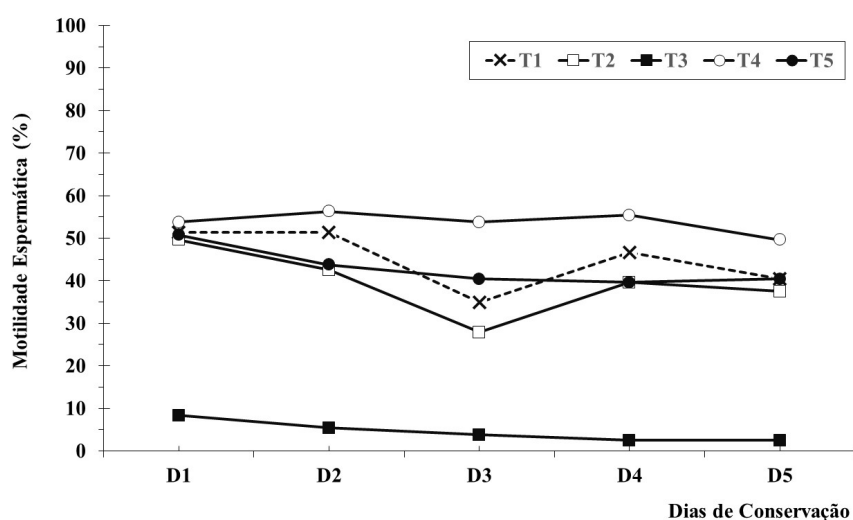


Figura 04: Valores médios da motilidade espermática (%), em diferentes tratamentos, do sêmen suíno conservado por sete dias a 17 °C, após duas horas de reaquecimento a 37 °C.

Obs.: T1 (controle) = diluído a 37 °C → 17 °C (7 dias); T2= 37 °C/ 6 horas → 17 °C (7 dias); T3= 37 °C/24 horas → 17 °C (7 dias); T4= 25 °C/6 horas → 17 °C (7 dias); T5= 25 °C/ 24 horas → 17 °C (7 dias).

A ação lesiva do choque térmico pode estar relacionada com a composição da membrana plasmática, onde as proteínas podem ser excluídas das regiões de fosfolipídios sólidos e concentrados em áreas fluidas (ALBERTS *et al.*, 2002). Quanto maior o choque térmico, maior a porcentagem de células lesadas, especialmente quando se usa diluente salino, causando perda de proteínas e redução da motilidade (ASTURIANO *et al.*, 2007). A incubação prévia do sêmen (Figs. 03 e 04), aumenta a resistência da célula ao tratamento térmico, entretanto, ainda precisa ser determinada a melhor relação entre a temperatura e o tempo de equilíbrio.

Após as duas horas de incubação, em todos os tratamentos, houve uma queda da motilidade, que variou de 20 (T4) até 30 (T2) pontos percentuais, vista entre os tratamentos com o mesmo tempo de incubação (6 horas), mas com temperaturas diferentes. Essa redução dos valores em relação ao tempo de incubação pode ser explicada pelas mudanças estruturais e funcionais dos espermatozoides armazenados, semelhante a um envelhecimento natural e podendo ser determinada pelas condições e tempo de armazenamento (PEZO *et al.*, 2019), tendo a temperatura um papel importante nessa influência, por isso a determinação da melhor relação entre estas duas características, temperatura e tempo de equilíbrio, é de suma importância para conseguir agregar aos espermatozoides uma maior resistência ao tratamento pelo frio.

Em um primeiro momento, a falta de incubação prévia do sêmen antes do resfriamento (T1) permitiu quedas da motilidade que variaram entre 20 e 25 pontos percentuais ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos (exceto T3). Durante o período de conservação do sêmen, após duas horas de incubação, a ação benéfica inicial trazida pelo período de equilíbrio não pôde ser mais evidenciada, particularmente nos tratamentos com uso de temperatura mais alta (T2) e com longo período de incubação (T5). A redução da motilidade pode ser atribuída à redução do metabolismo energético dos espermatozoides expostos a duas horas de incubação, devido à rápida utilização dos componentes do diluente pela elevação do metabolismo celular (SOUZA *et al.*, 2015), implicando danos diretos às organelas envolvidas na movimentação espermática, como a mitocôndria, prejudicando a atividade da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, provocando a redução na motilidade (DU, 2009).

Essa queda foi bem menos acentuada ($p < 0,05$), em temperatura e tempo de incubação de 25 °C e seis horas, respectivamente (T4). Esses resultados diferem dos encontrados por Kotzias-Bandeira (1999) no tocante ao tempo, mas são coerentes com os de Pursel *et al.* (1973), com relação a temperatura. Sabe-se que a ocorrência do choque térmico apresenta relação com a velocidade e o intervalo de resfriamento do sêmen, pois um resfriamento rápido deprime a taxa de respiração, a glicólise e a motilidade espermática (REIS, 1997). Os resultados deste trabalho corroboram com os de Reis (1997), pois houve sempre melhores resultados de motilidade quando se usou temperaturas mais próximas a do ejaculado e tempo de equilíbrio menor no tratamento prévio do sêmen antes do resfriamento.

É importante se considerar o binômio tempo e temperatura, pois Katzer (2009) não observou motilidade espermática melhor com o sêmen previamente incubado a 22 °C/8 horas, apresentando resultados similares aos obtidos sem incubação prévia. No entanto, a incubação do sêmen a 25 °C/6 horas, antes do resfriamento, apresentou os melhores resultados de

motilidade durante a conservação do sêmen. Esse resultado foi confirmado por Pursel *et al.* (1972), que verificaram que os espermatozoides dos suínos incubados entre 25 e 30 °C por 12 a 14 horas, tornam-se mais resistentes à ação de baixas temperaturas de conservação do ejaculado.

A incubação do sêmen a 25 °C/3,5 a 6,5 horas torna os espermatozoides do varrão mais resistentes à ação do resfriamento, podendo obter uma melhor motilidade, em comparação ao uso de uma incubação mais prolongada a temperaturas mais baixas (KATZER, 2009). Os resultados deste trabalho puderam comprovar essas observações, uma vez que os melhores resultados de motilidade foram obtidos quando o sêmen foi incubado por seis horas a 25 °C (T4).

Moreira *et al.* (2001) concluíram que o abaixamento gradual da temperatura de conservação do sêmen suíno não alterou, estatisticamente, a viabilidade espermática. Entretanto, verificou-se, com clareza, pelos resultados deste trabalho, que as temperaturas mais altas associadas a tempos de equilíbrio mais prolongados (T3) apresentaram um efeito deletério maior sobre a motilidade espermática, e que a incubação do sêmen antes de sua diluição, em temperatura de 25 °C (T4), melhorou a motilidade espermática após duas horas de incubação. Os espermatozoides suínos respondem diferentemente ao estresse térmico e isso pode ser observado como dano subletal ou morte celular, geralmente associada à perda de motilidade ou de integridade da membrana (BAJUK *et al.*, 2020).

Lesões conferidas à célula espermática durante o resfriamento são muitas vezes irreversíveis, causando alterações na permeabilidade da membrana plasmática, no potencial da membrana mitocondrial e na integridade do DNA, reduzindo, assim, a viabilidade espermática (BRYLA e TRZCINSKA, 2015). Dessa forma, os resultados da ação dos tratamentos experimentais deste trabalho, sobre as características de motilidade do sêmen suíno, são parte de um trabalho investigativo que deve ser executado no futuro.

CONCLUSÕES

As diferentes temperaturas e tempos de equilíbrio utilizados neste estudo influenciaram na conservação do sêmen suíno, em que uma temperatura de incubação pré-diluição mais elevada (37 °C) por período prolongado (24 horas) reduziu a resistência espermática ao abaixamento da temperatura, enquanto a combinação 25 °C/6 horas favoreceu a manutenção da motilidade espermática em teste de termorresistência (após 2 horas). Estudos mais aprofundados são necessários para que se possa estabelecer uma real relação entre a curva de abaixamento de temperatura (relação tempo x temperatura) e a resistência adquirida pelos espermatozoides ao choque térmico. Outras características, tais como morfologia espermática, integridade acrossomal e qualidade do DNA, também devem ser consideradas em trabalhos futuros, a fim de se poder determinar um novo e mais eficaz protocolo de conservação do ejaculado do varrão em temperaturas entre 15 e 17 °C.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed., New York: Garland Science, 2002. 1616p.
- ALEXIOU, V.; BASIOURA, A.G.; TSOUSIS, G.; TZIKA, E.D.; BOSCOS, C.M.; VATZIAS, G.; TSAKMAKIDIS, I.A. The effect of dilution temperature by two extenders with different specific cations on boar semen quality. *Veterinarski Arhives*, v.87, n.2, p.197-208, 2017.
- ALKMIN, D.V. Central de IA em suínos: Uma análise prática do processo de produção de sêmen de alta qualidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.327-330, 2019.
- ARAÚJO, L.R.S., BARROS, T.B., GUIMARÃES, D.B., CANTANHÊDE, L.F., DIAS, A.V., TONIOLLI, R. Use of alternative extenders and temperatures in long term storage of boar semen. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.1, p.26-35, 2016.
- ASTURIANO, J.F.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PEÑARANDA, D.S.; GARZON, D.L.; PÉREZ, J.S.; VICENTE, J.S.; JOVER, M. Effect of sperm cryopreservation on the European Eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, n.2, p.162-166, 2007.
- BAJUK, B.P.; ZRIMŠEK, P.; PIPAN, M.Z.; TILOCCA, B.; SOGGIU, A.; BONIZZI, L.; RONCADA, P. Proteomic Analysis of Fresh and Liquid-Stored Boar Spermatozoa. *Animals*, v.10, n.553, p.157-165, 2020.
- BRESCIANI, C., BIANCHERA, A., BETTINI, R., BUSCHINI, A., MARCHI, L., CABASSI, C.S., SABBIONI, A.; RIGHI, F.; MAZZONI, C.; PARMIGIANI, E. Long-term liquid storage and reproductive evaluation of an innovative boar semen extender (Fórmula12[®]) containing a non-reducing disaccharide and an enzymatic agent. *Animal Reproduction Science*, v.180, n.1, p.10–16, 2017.
- BRYŁA, M.; TRZCIŃSKA, M. Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Animal Reproduction Science*, v.163, p.157-163, 2015.
- DU, L. Antioxidation of melatonin on boar semen preservation. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, v.25, p.315–319, 2009.
- HOFMO, P.O.; ALMLID, T. Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. In: *BOAR SEMEN PRESERVATION*. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26, supl.01, p.111-122, 1991.
- JOFRÉ, I.; CUEVAS, M.; CASTRO, L.S.; LOSANO, J.D.A.; TORRES, M.A.; ALVEAR, M.; SCHEUERMANN, E.; ANDRADE, A.F.C.; NICHI, M.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.; ROMERO, F. Antioxidant effect of a polyphenol-rich Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) extract and its effect on the regulation of metabolism in refrigerated boar sperm. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v.2019, Article ID2917513, 15p., 2019.

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

KATZER, L.H. Resfriamento de sêmen suíno: efeito da temperatura de armazenamento, incubação prévia, taxa de resfriamento e diluentes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, n.3, p.97-98, 2009.

KOTZIAS-BANDEIRA, E. Influência de diferentes diluidores e temperaturas de refrigeração sobre a qualidade de sêmen suíno. *Brazilian Journal on Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.4, p.194-198, 1999.

LUONGO, C.; GARRAPPA, G.; LLAMAS-LÓPEZ, P.; RODRÍGUEZ-TOBÓN, E.; LÓPEZ-ÚBEDA, R.; ABRIL-SÁNCHEZ, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. Effect of boar seminal dose type (cervical compared with post-cervical insemination) on cooling curve, sperm quality and storage time. *Animal Reproduction Science*, v.212, n.1, p.1-8, 2019.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, n.2, p.519-526, 1996.

MOREIRA, F.R.C.; TONIOLLI, R.; DUARTE, A.B.G. Tempos de equilíbrio no processamento do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.3, p.214-225, 2001.

OLIVEIRA, M.K.B.; ZANDONAIDE, J.P.B.; SEVERO, N.C.; GOMES, A.L.; IGARASI, M.S.; PIFANO NETO QUINTAL, A.; VASCONCELOS, A.B. Comparação de diluidores comerciais na motilidade, funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.25, n.2, p.67-71, 2018.

OLIVEIRA, V.S.; MORELLI, K.G.; COUTINHO, G.T.R.M. Princípios básicos da manipulação, análise e envio do sêmen equino. *PUBVET*, v.13, n.10, p.430-437, p.1-9, 2019.

PALAZÓN, S.A.L.; CERVERA, E.M. Desarrollo de un prototipo para refrigerar dosis de semen de caprino durante el transporte entre comunidades autónomas: efectos sobre la calidad *in vitro* y resultados de fertilidad *in vivo*. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, v.31, n.1, p.95-120, 2018.

PAVANELI, A.P.P.; PASSARELLI, M.S.; FREITAS, F.V.; RAVAGNANI, G.M.; TORRES, M.A.; MARTINS, S.M.M.K.; ANDRADE, A.F.C. Resposta às condições capacitantes reflete a influência do plasma seminal sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal no sêmen suíno refrigerado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.529, 2017.

PEIXOTO, R.M.; ANDRIOLI, A. SANTOS, D.O.; PINHEIRO, R.R.; ARAÚJO, J.F.; SOUSA, A.L.M.; SILVA, D.F.; DAMASCENO, E.M.; TEXEIRA, M.F.S. Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado *Acta Scientiae Veterinariae*, v.45, n.1487, p.1-8, 2017.

PEZO, F.; ZAMBRANO, F.; URIBE, P.; RAMÍREZ-REVECO, A.; ROMERO, F.; SANCHÉZ, R. LED-based red light photostimulation improves short-term response of cooled boar semen exposed to thermal stress at 37 °C. *Andrologia*, v.51, n.5, p.132-137, 2019.

Recebido: jan./2021.

Publicado: dez./2022.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v.37, n.2, p.528-531, 1973.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, v.34, n.1, p.278-283, 1972.

REIS, F.T. Colheita, avaliação e manipulação do ejaculado de suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.3, p.22-29, 1997.

SILVA, M.C.; OLIVEIRA MOURA, L.C.; VAZ DE MELO, M.I.; MELO MAMBRINI, J.V.; NEVES, M.M.; HENRY, M.R.J.M., SNOECK, P.P.D.N. Prolonged post cooling but not pre-cooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low-density lipoproteins. *Small Ruminant Research*, v.119, n1/3, p.88-95, 2014.

SINGH, P.; KUMAR, N.; PANDEY, R.P. Large White Yorkshire Boar Semen Preservation at Refrigeration Temperature. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, v.8, n.6, p.3403-3408, 2019.

SOUZA, W.L.; COSTA, J.M. S.; MORAES, E.A.; COELHO, V.G.; MAGALHAES, L. M.V.; LIMA, D.I.B. Efeito da dimetilformamida associada ou não ao glicerol sobre a longevidade espermática de caprinos após o resfriamento e descongelamento. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.18, p.337-339, 2015.

TONIOLLI, R.; MOREIRA, F.R.C.; TONIOLLI, L.S.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S. Longevidade do espermatozoide suíno, incubado em diferentes tempos e temperaturas de equilíbrio. *Ciência Animal*, v.28, n.1, p.30-46, 2018.

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

WATSON, P.F. Effects of cold shock on sperm cell membranes. In: BORIS, G.J.; CLARKE, A. (Ed): *Effects of low temperatures on biological membranes*. 1ª ed., Academic Press London, p.189-218, 1981.

WEITZE, K.F. Long-term storage of extended boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.1, supl.01, p.231-253, 1991.