

**CURVAS DE RESFRIAMENTO DO SÊMEN DO VARRÃO
DILUÍDO EM ACP®103 ADICIONADO DE GEMA
DE OVO EM CONCENTRAÇÃO FIXA**

***COOLING CURVES OF THE BOAR SEMEN DILUTED IN ACP®103
EXTENDER ADDED OF POWDERED EGG YOLK IN FIXED
CONCENTRATION***

Tatyane Bandeira Barros¹
Luciana de Souza Toniolli¹
Daianny Barboza Guimarães¹
Eduardo Nunes de Freitas¹
Thalles Gothardo Pereira Nunes¹
Ricardo Toniolli^{*}

¹Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

^{*}Autor para correspondência - ricardo.toniolli@uece.br

Resumo

A conservação do sêmen suíno em temperaturas mais baixas pode permitir uma maior expansão da inseminação artificial nessa espécie. A gema de ovo apresenta propriedades crioprotetoras já amplamente testadas na conservação seminal de diversas espécies. Este trabalho teve por objetivo testar diferentes curvas de temperatura na conservação do sêmen suíno diluído em água de coco em pó (ACP®-103) acrescido de 7% de gema de ovo e verificar qual delas mantém por mais tempo a viabilidade espermática. Para tanto, o sêmen de 36 ejaculados foi diluído e conservado a 17, 10 e 5 °C. Diariamente foram realizadas análises de vigor e motilidade e nos dias D0, D2 e D4 o sêmen foi avaliado quanto à sua viabilidade, morfologia acrossomal e resistência osmótica. Para a análise estatística foram utilizados os testes de Kruska-Wallis, com pós-teste de Dunns (dados não paramétricos) e Anova com teste de Tukey (dados paramétricos). A conservação à temperatura de 10 °C foi a que melhor manteve o vigor espermático e a motilidade em níveis adequados para ser utilizado em um programa de inseminação artificial. As análises de vitalidade, morfologia e teste hiposmótico não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos avaliados. Em conclusão, a melhor curva de temperatura foi a de 10 °C com sêmen diluído por manter por um período maior a viabilidade da célula espermática suína.

Palavras-chave: água de coco em pó; conservação; gema de ovo; sêmen suíno.

Abstract

The conservation of boar semen at lower temperatures might contribute to the further expansion of artificial insemination in this species. Egg yolk cryoprotectant properties have already been extensively tested on sperm cryopreservation of several species. This study aimed to test different temperature curves for the conservation of boar semen diluted with coconut milk powdered (ACP®-103) add 7% egg yolk and to verify which one better maintains sperm viability. For this, 36 ejaculates were diluted and stored at 17, 10 and 5 °C. Daily analysis of vigor and motility were performed, and on days D0, D2, and D4 semen was evaluated regarding vitality, morphology, and osmotic resistance. For the statistical analysis we performed the tests of Kruska-Wallis with Dunns post-test (nonparametric data) and ANOVA and Tukey test (parametric data). The storage temperature of 10 °C was the best one to maintain spermatoc motility at appropriate levels to be used in an artificial insemination program.

Analyses of viability, morphology, and hypoosmotic test did not show statistical difference among the treatments. In conclusion, the best temperature curve was 10 °C with diluted semen previously kept at 17 °C to maintain the viability of sperm cells in pigs for a longer period.

Keywords: boar semen; coconut water powder; conservation; egg yolk.

Enviado em: 23 março 2012

Aceito em: 26 setembro 2016

Introdução

Os espermatozoides são muito susceptíveis ao choque térmico bem como ao envelhecimento⁽¹⁾, particularmente quando o ejaculado *in natura* é rapidamente resfriado, o que resulta na perda da viabilidade de um grande número de células⁽²⁾, fazendo com que a conservação da dose de sêmen seja comprometida⁽³⁾. Além disso, fatores como o modo de armazenamento, o diluente utilizado e o tempo de conservação podem também influenciar na viabilidade dos espermatozoides⁽⁴⁾.

A boa conservação espermática em temperaturas mais baixas pode colaborar para uma maior expansão da inseminação artificial em suínos, principalmente em regiões onde predominam temperaturas elevadas durante todo o ano. Isso porque a possibilidade de conservar o sêmen em temperaturas mais baixas permite uma redução de custos pelo fato de dificultar o desenvolvimento microbiano, que impede um maior período de conservação do ejaculado⁽⁵⁾ e, assim, permite uma melhor utilização dos ejaculados dos reprodutores da granja.

O diluente é utilizado, dentre outras finalidades, com o intuito de proteger os espermatozoides contra o choque térmico que ocorre durante o resfriamento do sêmen e que pode causar danos irreversíveis à célula⁽⁶⁾. Um diluente alternativo como a água de coco tem sido usado com bons resultados na conservação do sêmen de diversas espécies domésticas, tais como suínos⁽⁷⁾, caprinos⁽⁸⁾, ovinos⁽⁹⁾, caninos⁽¹⁰⁾ e felinos⁽¹¹⁾. Sabe-se que a longevidade espermática no sêmen do varrão mantém-se satisfatória durante 72 horas, à temperatura de 16 °C, em diferentes diluentes até então utilizados⁽¹²⁾, período este insuficiente para o bom aproveitamento de reprodutores. Dessa forma, a avaliação de novos meios de diluição também é importante para se obter uma adequada conservação da célula espermática⁽¹³⁾.

Dentre os diferentes crioprotetores extracelulares usualmente adicionados aos meios diluentes visando à refrigeração do sêmen, a gema de ovo promove uma boa proteção contra o choque térmico causado pelo resfriamento⁽¹⁴⁾. Ela já foi utilizada em diferentes trabalhos, como diluente de sêmen de diversas espécies tais como suínos⁽¹⁵⁾, bovinos⁽⁶⁾ e cães⁽¹⁰⁾, sendo que seu uso representa uma possibilidade de um maior e melhor armazenamento para doses de sêmen.

O processo de refrigeração do sêmen é essencial para os programas de inseminação artificial; entretanto, ele provoca danos às células, com a ruptura das membranas espermáticas, particularmente a do acrossoma⁽¹⁶⁾, que levam a uma diminuição do tempo de sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, afetando desta forma o seu potencial fecundante. Para se prolongar o período de sobrevivência espermática, faz-se necessário reduzir a atividade metabólica, seja por inibidores químicos ou pela redução da temperatura após a diluição^(17;18). Desta forma, a inseminação artificial pode ter uma nova dimensão se for utilizada com aplicação de novas tecnologias de conservação espermática⁽¹⁹⁾. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma nova curva de resfriamento que permita a manutenção da viabilidade espermática por um período maior de tempo, associada ao uso de um novo diluente, que poderá ser uma alternativa importante para a tecnologia da conservação do sêmen de diversas espécies.

Material e Métodos

Para o experimento foram selecionados animais com idade variando entre 12 e 24 meses, em sistema rotineiro de coleta, provenientes da Granja Regina, em Maranguape, Ceará, e do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen da FAVET/UECE. O sêmen de um total de 11 varrões foi coletado uma vez por semana durante 20 semanas. Antes de cada coleta, foi realizada uma higienização do prepúcio com água tratada, seguida de esgotamento prepucial por pressão manual no sentido caudo-cranial e secagem da região com papel toalha descartável. Para a coleta do sêmen, foi empregada a técnica da mão enluvada, sendo aproveitado o ejaculado total, após a separação da parte gelatinosa, com o sêmen colhido em recipiente plástico, coberto por filtro e protegido em copo térmico de coleta.

Em seguida à coleta, o ejaculado foi avaliado quanto à concentração ($\times 10^6$ spz/mL em espectrofotômetro), volume (mL em balança digital) e total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz). Para o exame do vigor espermático (0 a 5)⁽²⁰⁾ e do total de espermatozoides móveis (%), uma amostra do sêmen (15 μ L) foi colocada entre lâmina e lamínula e levado ao microscópio óptico em um aumento de 200 vezes. Para o sêmen *in natura*, após esta primeira avaliação, foram utilizados 36 ejaculados, dentre os diferentes reprodutores, que apresentaram valores acima de ≥ 80 % de espermatozoides móveis e $\geq 3,5$ para o vigor espermático. Esta prática visou à utilização do sêmen de todos os varrões, mas dentro do mais alto nível possível da qualidade espermática, de forma a tornar o sêmen mais homogêneo nos diferentes tratamentos experimentais.

De cada ejaculado foi retirado um total de 8×10^9 espermatozoides, incubados inicialmente a 30 °C por 30 minutos (antes da diluição) e repartidos igualmente entre os diferentes tratamentos, a uma concentração de 35×10^6 spz/mL. O volume final para cada tratamento (25 mL = sêmen + diluente) foi aliquotado em tubos de ensaio, num total de cinco tubos (1 tubo/dia de análise/tratamento). De acordo com a concentração de cada ejaculado, volumes diferentes de diluente foram utilizados a fim de completar o volume final de cada tratamento, respeitando-se um total de 175×10^6 spz/tubo em 5 mL de volume.

Os tubos foram mantidos em três diferentes temperaturas: 1) 17 °C; 2) 10 °C e 3) 5 °C durante todo período de conservação (quatro dias), sendo o dia da coleta considerado dia zero (D0), e o último D4. A cada dia de conservação, foi retirado um tubo de ensaio de cada ejaculado em cada tratamento, para ser incubado em banho-maria a 37 °C por 10 minutos para análises posteriores.

O diluente utilizado foi a água de coco em pó (ACP[®]-103), oriunda da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do “spray dry”⁽²¹⁾, sendo reconstituída com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP[®]-103 + 100mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80 mg/100mL e adicionado de 7% de gema de ovo. A diluição do ejaculado foi feita a 30 °C, acrescentando-se o diluente ao sêmen *in natura*. Desta forma, foram formados diferentes tratamentos baseados nas diferentes curvas de resfriamento e temperatura de conservação do sêmen a serem testadas: **T1** = Diluição do sêmen em ACP[®]-103 + 7% de gema de ovo a 30 °C e em seguida conservação a 17 °C (controle) durante 4 dias; **T2** = Diluição do sêmen em ACP[®]-103 + 7% de gema de ovo a 30 °C; incubação a 17 °C por 1h e em seguida conservação a 10 °C durante 4 dias; **T3** = Diluição do sêmen em ACP[®]-103 + 7% de gema de ovo a 30 °C; incubação a 17 °C por 1h; nova incubação a 10 °C por 1h e em seguida conservação a 5 °C durante 5 dias.

Em todos os dias de conservação (D0, D1, D2, D3 e D4) foram avaliadas as seguintes características: vigor espermático (0 a 5)⁽²⁰⁾; total de espermatozoides móveis (0 a 100%); integridade acrossômica e vitalidade espermática (%) e teste hiposmótico (%). O sêmen diluído e conservado durante quatro dias foi incubado em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos e analisado por meio de microscópio óptico.

Do sêmen diluído após aquecimento em banho-maria a 37 °C, durante 10 minutos, foi retirada uma alíquota de 10 μ L, colocada em uma lâmina, coberta por uma lamínula e levada ao microscópio

óptico, com um aumento de 200x, em que pelo menos três campos do microscópio eram analisados. Para os critérios utilizados para a análise de vigor⁽²⁰⁾, foi levado em consideração o tipo de movimento (circulatório, lento sem sair do campo do microscópio, rápido ou flechantes). Já para a motilidade foi feita uma estimativa da porcentagem de células móveis presente em cada campo de microscópio em relação ao total de células deste mesmo campo.

Os exames morfológicos foram realizados nos dias D0, D2 e D4. As análises foram divididas em: a) viabilidade (% de espermatozoides vivos); e b) % de espermatozoides morfológicamente normais⁽²²⁾. Para se realizar este exame, foram feitos esfregaços de sêmen corados pela solução de azul de bromofenol. A solução corante foi formada por: azul de bromofenol = 0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada = 10 mL; medidas a osmolaridade da solução e se necessário ajustada com água destilada até ficar entre 300 e 310 mOsm. A solução foi conservada em geladeira a 5 °C. Para se preparar o esfregaço, juntaram-se gotas de 15 µL de sêmen com outra de corante sendo homogeneizadas. Após 30 segundos retirou-se uma gota desta mistura para se preparar o esfregaço que secou à temperatura ambiente antes da análise. O sêmen e o corante foram mantidos à mesma temperatura (37 °C). Foram contadas 200 espermatozoides por amostra, por meio de microscopia óptica com lente de imersão, com aumento de 1000x.

O teste hiposmótico também foi realizado nos dias D0, D2 e D4 e permitiu a avaliação da funcionalidade da membrana do espermatozoide, por meio de uma prova de resistência ao choque osmótico. A técnica consistiu da adição de 1 mL de sêmen diluído em 15 mL de água destilada e mantidos por 15 minutos em banho-maria a 37 °C (solução A). Após o período de incubação, em 1 mL da solução A foi adicionado 0,5 mL de formol salino a 1% (solução B). Dessa nova solução (B) foi retirada uma alíquota de 15 µL, colocada em uma lâmina, recoberta por uma lamínula e em seguida levada ao microscópio óptico com um aumento de 40x, sendo contado um total de 200 células⁽²³⁾. O espermatozoide com a cauda reta é indicativo de ruptura de membrana, os que permanecerem com membrana íntegra apresentam cauda enrolada.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. A análise estatística foi realizada através da avaliação das médias e desvios-padrão. Para os dados não paramétricos foi realizado o teste de Kruska-Wallis e pós-teste de Dunns e para os dados paramétricos foram aplicados o teste de ANOVA e pós-teste de Tukey. A análise das diferenças entre médias foi realizada por meio do programa *Graphpad prisma 5.0*. Foi utilizado um índice de significância estatística de 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A fração espermática do sêmen *in natura* dos 36 ejaculados analisados no experimento apresentou aspecto normal, volume médio de 249,4 mL e concentração média de $340,4 \times 10^6$ spz/mL. Os valores médios encontrados para estas características encontraram-se dentro da normalidade para o sêmen na espécie suína⁽⁵⁾. O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade média de $90\% \pm 6,3$ e vigor espermático de $4,0 \pm 0,5$, com 10% de alterações morfológicas totais. Os padrões seminais desejáveis para que um varrão seja utilizado como doador de sêmen em programas de inseminação artificial, utilizando-se a refrigeração como método de conservação, são: motilidade superior a 70% no momento da diluição e as anormalidades espermáticas totais que não ultrapassem 20%⁽²⁴⁾. Desta forma, constatou-se que a matéria-prima (ejaculado) para o desenvolvimento deste trabalho foi de ótima qualidade, apresentando-se com características acima dos valores mínimos preconizados pela literatura consultada.

Uma tendência decrescente natural do vigor e da motilidade espermática foi observada em todos os tratamentos. Essa queda pode ter ocorrido em virtude das alterações no meio diluente durante o período de conservação⁽²⁵⁾. Cardoso et al.⁽²⁵⁾, ao realizarem um estudo sobre a conservação do sêmen canino utilizando diferentes concentrações de gema de ovo adicionada ao meio ACP®-104, observaram uma diminuição do pH significativa nos meios que continham gema de ovo durante o

período de armazenamento.

No primeiro dia de conservação, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores destas características nas três temperaturas analisadas ($p > 0,05$). Em D0, todas as três temperaturas foram eficientes na manutenção da viabilidade espermática, como mostra a Tabela 1. No D1, o tratamento T2 manteve os maiores valores do vigor (tabela 1) e da motilidade (Tabela 2), permanecendo em níveis adequados ($2,2 \pm 0,8$) para uma possível utilização do sêmen em um programa de inseminação artificial. O mesmo foi observado por Alkimin et al.⁽²⁶⁾ ao comparar diferentes porções do ejaculado suíno conservado em temperaturas de 17 e 5 °C, também utilizando concentração fixa de gema de ovo. Segundo esses autores, a motilidade foi superior a 50% nas primeiras 24 horas de armazenamento nas temperaturas testadas.

Esse dado é de extrema importância já que 85% de todas as inseminações artificiais em suínos são conduzidas no dia da coleta ou no dia seguinte⁽²⁾. Assim, esta temperatura mais baixa proporcionaria uma melhor condição de armazenagem da dose, bem como minimizaria custos de produção, pois dispensaria a utilização de conservadores de sêmen, que apresentam maiores custos de aquisição⁽⁵⁾.

Tabela 1. Vigor espermático do sêmen suíno conservado em três diferentes temperaturas (17, 10 e 5 °C) no diluente ACP®-103 adicionado de 7% de gema de ovo

Temperaturas	Dias de Conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
T1 (17 °C)	2,8±0,9	1,1±1,1 ^a	0,1±0,3 ^a	0,0 ^a	0,0
T2 (10 °C)	2,9±0,8	2,2±0,8 ^b	1,5±1,2 ^b	0,5±0,8 ^b	0,1±0
T3 (5 °C)	2,8±0,8	1,8±1,0 ^{a,b}	1,2±1,2 ^b	0,3±0,7 ^{a,b}	0,0

a, b, c Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos demais dias de análise, os resultados nas temperaturas 10 e 5 °C comportaram-se de maneira similar e foram sempre superiores aos resultados a 17 °C. Isto pode ser explicado pelo fato de que temperaturas moderadamente reduzidas (17 °C) não conseguem diminuir satisfatoriamente o metabolismo celular. Além disso, não é possível realizar o controle de possíveis contaminações microbiológicas com a mesma efetividade que se teria em temperaturas inferiores^(27,28), principalmente quando ao meio diluente são adicionadas substâncias como a gema de ovo, que é uma grande fonte de proteínas e ainda pode vir com suas contaminações naturais. Fatores como alterações de pH e osmolaridade do meio também podem ocorrer, já que com o decorrer do tempo há o consumo do substrato energético e a produção de metabólitos, o que diminui a viabilidade espermática⁽²⁹⁾.

Apesar dos valores baixos de vigor e motilidade obtidos a partir do D3, esses foram melhores com as curvas de temperatura de 10 e 5 °C (D3) e de 10 °C (D4), em comparação às de 17 °C (Tabelas 1 e 2). Embora baixos valores tenham sido encontrados a partir de D3 para essas características e esses valores sejam incompatíveis com a utilização do sêmen para a inseminação artificial em suínos, deve-se considerar que o sêmen foi conservado a temperaturas abaixo da convencional (17 °C). Assim, pode-se demonstrar a capacidade da gema de ovo na preservação dessas características, conforme resultados também encontrados por outros pesquisadores⁽³⁰⁾.

A viabilidade espermática, diferentemente do encontrado em outros estudos⁽³¹⁾, manteve-se semelhante em todas as temperaturas testadas (T1 = 78%; T2 = 68%; T3 = 71%) em D0. Isso sugeriu uma ação da gema de ovo sobre a manutenção da porcentagem de espermatozoides vivos, principalmente em temperaturas mais baixas do que a normalmente utilizada na conservação (17 °C) espermática (Tabela 3). Silva et al.⁽³¹⁾, verificaram que o sêmen mantido a 5 °C apresentou, de modo geral, um número de células vivas inferior ao do sêmen mantido a 17 e 12 °C; entretanto, nesse experimento não foi utilizada a gema de ovo no diluente, fato que pode explicar as diferenças encontradas em relação aos resultados deste trabalho.

Tabela 2. Motilidade espermática do sêmen suíno conservado em três diferentes temperaturas (17, 10 e 5 °C) no diluente ACP®-103 adicionado de 7% de gema de ovo

Temperaturas	Dias de Conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
T1 (17 °C)	81±16	28 ±33 ^a	2±9 ^a	0,0 ^a	0,0
T2 (10 °C)	81±13	55±25 ^b	31±28 ^b	9±16 ^b	3±7,5
T3 (5 °C)	77±18	39±28 ^b	21±26 ^b	6±15 ^{a,b}	0,0

a, b, c Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Viabilidade espermática do sêmen suíno conservado em três diferentes temperaturas (17, 10 e 5 °C) no diluente ACP®-103 adicionado de 7% de gema de ovo

Temperaturas	Dias de Conservação		
	D0	D2	D4
T1 (17 °C)	78±21,7 ^a	32±34,8 ^a	0,0
T2 (10 °C)	68±33,3 ^a	21±33,0 ^a	0,0
T3 (5 °C)	71±19,3 ^a	56±41,0 ^a	0,0

a, b, c Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Ao comparar o D4 das Tabelas 1, 2 em relação aos resultados de vitalidade mostrados na Tabela 3, observou-se que, nas análises de vigor e motilidade, duas temperaturas zeraram os resultados e em apenas uma delas (10 °C) o resultado foi um pouco maior do que zero. Já para a análise de viabilidade (Tabela 3), neste mesmo período, todas as temperaturas zeraram os resultados. O que deve ter ocorrido é que durante a análise, entre as 200 células contadas, não foram encontrados espermatozoides vivos. Isso pode acontecer, principalmente quando a amostragem de células classificadas como apresentando motilidade e, por conseguinte, vivas, for baixa, como mostrado nas Tabelas 1 e 2. Resultados semelhantes foram encontrados⁽³²⁾ para a refrigeração do sêmen canino em caixa térmica. Ao utilizar o corante vital eosina amarela, a porcentagem de espermatozoides não corados (com vitalidade), ainda nas primeiras horas de conservação, foi um pouco menor do que a motilidade achada para o mesmo período. Tanto nos resultados deste trabalho como nos desse autor, possivelmente ao realizar um teste estatístico entre essas análises de vitalidade e motilidade, não seria observado diferença significativa, em virtude dos baixos valores.

Tabela 4. Porcentagem de células com morfologia normal no sêmen suíno conservado em três diferentes temperaturas (17, 10 e 5 °C) no diluente ACP®-103 adicionado de 7% de gema de ovo

Temperaturas	Dias de Conservação		
	D0	D2	D4
T1 (17 °C)	53±25,7 ^a	62±19,2 ^a	62±19,4 ^a
T2 (10 °C)	69±26,0 ^a	52±31,2 ^a	51±30,3 ^a
T3 (5 °C)	56±26,4 ^a	63±36,4 ^a	63±35,8 ^a

a, b, c Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em D0, valores superiores a 50% das células espermáticas em todas as temperaturas encontravam-se com a morfologia normal (Tabela 4) e membrana funcional (Tabela 5). Alguns autores⁽³³⁾ afirmaram que a integridade da membrana plasmática pode ser analisada por meio do teste hiposmótico, pois o

espermatozoide íntegro e capaz de realização de trocas iônicas com o meio em que ele se encontra, bem como de manter seu metabolismo, revela a qualidade da membrana plasmática da célula e colabora com a manutenção de sua capacidade fertilizante.

As análises da morfologia (Tabela 4) e teste hiposmótico (Tabela 5) não apresentaram diferenças estatísticas entre os resultados, nas diferentes temperaturas testadas, durante todo o período de armazenamento do sêmen. Este resultado foi compatível aos achados de outros autores⁽³⁴⁾, podendo ser explicado pelo fato de que os machos utilizados eram animais selecionados de acordo com um padrão mínimo de qualidade espermática.

Pode acontecer um aumento de anormalidades no ejaculado canino resfriado e conservado a 4 °C, quanto maior for a concentração da gema de ovo⁽²⁵⁾. Isso demonstra mais uma vez que, para a espécie suína, a concentração de 7% de gema de ovo foi eficiente na manutenção da morfologia espermática, quando este sêmen foi conservado em temperaturas abaixo de 17 °C.

O comportamento da análise morfológica demonstrou que a ação protetora da gema de ovo contra os danos causados pelo frio, uma vez que os resultados do sêmen submetido a baixas temperaturas, como as de 10 e 5 °C, foram compatíveis aos obtidos na temperatura de conservação padrão (17 °C). Alguns autores⁽³⁵⁾, ao testarem diferentes curvas de temperatura (17, 12 e 5 °C) na conservação do sêmen suíno diluído em BTS e Androhep, mas sem agentes crioprotetores, observaram resultados semelhantes quanto à morfologia espermática, o que revelou que, ao se utilizar o diluente ACP, faz-se necessária a adição de substâncias como a gema de ovo para promover uma maior proteção à morfologia espermática, apesar de a análise ser dificultada quanto maior for a sua concentração no meio diluente. Esta dificuldade também foi observada⁽³¹⁾ ao se compararem as concentrações de 5, 10 e 20% de gema de ovo adicionada ao diluente água de coco em pó (ACP®-106) na criopreservação do sêmen canino.

Quanto à análise da porcentagem de formas reativas à solução hiposmótica (teste hiposmótico, Tabela 5), não foi observada diferença significativa entre as diferentes curvas de temperatura testadas e a porcentagem de células espermáticas com cauda enrolada. Isso demonstra que a preservação do sêmen suíno pós-diluição em ACP®-103, em temperaturas inferiores a de 17 °C, não contribui para maiores danos à membrana plasmática do espermatozoide. Fato semelhante a este foi observado⁽³⁶⁾ ao se diluir e resfriar o sêmen equino a 5 °C, por um período de seis dias; entretanto, foi observada uma queda gradativa na porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada à medida que se aumentou o período de armazenamento, nas três temperaturas testadas (Tabela 5).

Era de se esperar uma relação direta entre a viabilidade da célula espermática com os resultados de integridade de membrana, o que não foi observado neste estudo, em que a motilidade espermática diminuiu a valores próximos de zero, a partir de D3, enquanto que a integridade da membrana plasmática, ainda em D4, apresentou resultados superiores a 28% de espermatozoides com membranas funcionais. A queda da motilidade pode ocorrer em virtude de alterações na energia disponível ou danos aos elementos do axonema e não somente em virtude de mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática⁽³⁷⁾. Assim, torna-se possível um resultado como o encontrado no presente estudo, em que foi observada uma queda na motilidade sem, contudo, proporcionar altas taxas de lesão na membrana plasmática.

Tabela 5. Resistência osmótica do sêmen suíno conservado em três diferentes temperaturas (17, 10 e 5 °C) no diluente ACP®-103 adicionado de 7% de gema de ovo

Temperaturas	Dias de Conservação		
	D0	D2	D4
T1 (17 °C)	54± 14,2 ^a	33±17,2 ^a	34±7,5 ^a
T2 (10 °C)	51± 16,0 ^a	45±17,7 ^a	28±9,1 ^a
T3 (5 °C)	48±17,0 ^a	36±17,7 ^a	28±12,6 ^a

a, b, c Letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

Conclusões

De uma maneira geral, as três curvas de resfriamento podem ser adotadas visando ao preparo de doses de sêmen para programas de inseminação artificial, permitindo novas possibilidades para a conservação do sêmen suíno.

Considerou-se que a melhor curva foi a da temperatura a 10 °C, por manter por um maior período de tempo a motilidade espermática, devendo ser este o protocolo adotado em trabalhos rotineiros de refrigeração de sêmen.

As demais curvas também permitem a utilização do sêmen diluído, mas por período de tempo menor, o que dificulta o envio de doses de sêmen para locais mais distantes, bem como a utilização do ejaculado por um tempo maior, sem perda do seu poder fecundante.

Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq pelo apoio financeiro e à Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, diretora da ACP® Biotecnologia, por ter cedido tão gentilmente a água de coco em pó.

Referências

1. Moreira FRC, Toniolli R, Duarte ABG. Tempos de equilíbrio no processamento do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2001;25(3):444-446.
2. Johnson LA, Weitze KF, Fisher PL, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 2000;62(43-172).
3. Bortolozzo FP, Wentz I, Bennemann PE, Bernardi ML, Wollmann EB, Ferreira FM, Neto GB. *Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. Copyright, Porto Alegre, 2005. 185p.
4. Huo L, Ma X, Yang, Z. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrossome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*. 2002;54(1-12).
5. Corrêa MN, Meincke W, Lucia Jr. T, Deschamps JC. *Inseminação artificial em suínos*. Copyright. Pelotas, Brasil, 2001, 194p.
6. Alberti K, Carmo MT, Oba E, Mendonça ALZ, Souza DB, Dell'Aqua Jr. JA, Vianna FP, Papa FO. Eficiência de novo diluente na congelabilidade de sêmen bovino. *Acta Scientie Veterinariae*, 2004;32(Suplemento):176.
7. Toniolli R, Courot M, Combarous Y, Bussirer J. Fração ativa da água de coco: Conservação e fertilidade do sêmen de suíno. *Revista Ciência Animal*. 2007;17(2):91-100.
8. Azevedo DMMR, Toniolli, R. Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácido 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos marota. *Ciência Animal*. 1999;9(1):37-42.
9. Braz VB, Araújo AA, Nunes JF, Machado VP, Moura AAA, Oliveira KPL. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2003;27(3):328-329.
10. Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. *Ciência Rural* 2000;30(6):1021-1025.

11. Silva TFP, Ackermann CL, Pinheiro FTS, Silva LDM Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007, Curitiba, PR, 2007. Belo Horizonte: CBRA, 2007.
12. Figueirôa PTB, Salviano Neto P, Oliveira RR. Avaliação da viabilidade do sêmen suíno submetido à refrigeração. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2001;25:442-445.
13. Salgueiro CCM, Nunes JF, Oliveira KLP, Vieira VE, Gondin JM, Mateos-Rex E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2002;Supl. 5:96-98.
14. Andrabi SMH. Fundamental principles of cryopreservation of *bos taurus* and *bos indicus* bull Spermatozoa. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2007;9(2):367-369.
15. Bathagate R, Maxwell WMC, Evans G. Studies on the effect supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on *in vitro* post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006;41:68-73.
16. Althouse GC, Wilson TMME, Kuster C, Parsley M. Characterization of lower temperatures storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*. 1998;50:535-543.
17. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:143-172.
18. Zeng W, Terada T. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reproduction, Fertility and Development*. 2000;12:223-228.
19. Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martinez EA. Challenges in pig artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006;41, supp. 2:43-53.
20. Toniolli R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation. Université François Rabelais de Tours - France, These de Doctorat, 91p., 1996. (Cópia da Tese na Biblioteca de Universidade Estadual do Ceará). Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=182303>
21. Salgueiro CCM, Nunes JF, Oliveira KPL. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2002;sup.1(5):96-98.
22. Bortolozzo FP, Wentz I, Bennemann PE, Bernardi ML, Wollmann EB, Ferreira FM, Neto GB. Suinocultura em ação: Inseminação Artificial na suinocultura tecnificada. Copyright, Porto Alegre, Brasil, 2005, 185p.
23. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005;64:492-504.
24. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3ª Ed. – Belo Horizonte, 2013. 104p.
25. Cardoso JFS, Paula NRO, Uchoa DC, Silva LDM. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae*. 2010;1(2):146-152.
26. Alkimin DV, Silva Filho JM, Palhares MS, Siqueira AP, Machado GS, Silva CLA, Tarantim TC. Efeito da porção do ejaculado e do método de resfriamento sobre as características físicas do sêmen suíno. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2011;63(6):1287-1294.
27. Sanchez RS. Conceito e fundamentos utilizados na inseminação artificial de suínos. *Suínos & Cia*. Ano I, n.02, p.18-22, 2003.
28. Moraes EA, Torres CAA, Guimarães, JD, Carvalho, GR, Murgas, LDS, Costa EP. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 °C e 5 °C. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010;39(7):1450-1456.

29. Fontenele OS, Cardoso JFS, Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa, DC, Silva,LDM. Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciência Animal*, 2002;12:153-156.
30. Silva GQ, Toniolli R, Chaves RN, Morais RM, Moreira FRC, Duarte ABG. Uso da gema de ovo como componente do diluidor do sêmen suíno. *Pork World, Ed. Animal World*, 2007.
31. Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. Comparação entre água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2005;43:767-774.
32. Mota-Filho AC. Conservação do sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas. *Acta Veterinaria Brasília*. 2007;1(3):78-83.
33. Juliano F, Serret CG, Schneider A, Rabassa VR, Wayne CE, Vidor T, Lucia Junior T, Deschamps JC, Bianchi I, Corrêa MN. Efeito do diluente pigpel na qualidade do sêmen suíno refrigerado em diferentes temperaturas. *Semina: Ciências Agrárias*. 2009;30(4):899-906.
34. Matos DM, Araujo AA, Roberto IG, Toniolli R. Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen do varrão. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2009;10(4):999 - 1009.
35. Katzer LH, Barbardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I. Qualidade de sêmen suíno resfriado sob a influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. *ARS Veterinária*. 2004;20(2):233-241.
36. Melo MIV, Henry M, Beker ARCL. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2005;57(6):757 - 763.
37. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 1995;7:871 – 891.