

## Influência de diferentes diluentes e temperaturas de refrigeração sobre a qualidade de sêmen suíno

CORRESPONDÊNCIA PARA:  
Edna Kotzias-Bandeira  
Departamento de Medicina  
Veterinária  
Universidade Federal Rural de  
Pernambuco  
R. Dom Manoel de Medeiros, s/nº,  
Dois Irmãos. 52171-900 - Recife - PE  
e-mail: ebande@elogica.com.br

## Influence of different diluents and cooling temperatures on the quality of boar semen

1- Tierärztliche Hochschule Hannover  
(Escola Superior de Medicina  
Veterinária de Hannover), Alemanha

Edna KOTZIAS-BANDEIRA<sup>1</sup>

### RESUMO

Foram colhidos seis ejaculados de seis diferentes cachações e diluídos com Androhep e Merck III, utilizando-se diferentes temperaturas de refrigeração. Após avaliação (aparência, volume, concentração, motilidade e morfologia), o ejaculado foi fracionado em porções de 100 ml (2 bilhões/ml) e diluído na proporção 1 + 1. As porções de sêmen foram resfriadas lenta (32°C ⇒ 20°C ⇒ 17°C ⇒ 5°C) ou rapidamente (32°C ⇒ 5°C) durante 2, 24 ou 48 horas. Após cada intervalo de refrigeração, 5 ml de sêmen foram incubados a +38°C e avaliados quanto à aparência, volume, concentração, motilidade e morfologia<sup>4</sup>. A refrigeração das diferentes porções foi medida por um termômetro eletrônico (Therm Typ 2280-8, Fa. Minitüb - from -200,0 until + 600,0°C) introduzindo-se o eletrodo no sêmen. A refrigeração lenta mostrou maior motilidade e NAR (p<0,05) do que a rápida. Não houve diferença significativa (p<0,05) entre os diluentes Androhep e BTS, mas o diluente Merck III teve influência inferior sobre a qualidade do sêmen de suíno.

**UNITERMOS:** Diluentes; Suínos; Refrigeração.

### INTRODUÇÃO

#### Influência da refrigeração

A influência do meio diluidor, da incubação e da taxa de refrigeração sobre a sensibilidade ao choque frio do sêmen suíno foi investigada por Weber<sup>16</sup>. A motilidade e a integridade do acrossomo do espermatozóide resfriado a 5°C foi significativamente mais baixa que o resfriado a temperaturas de 25°C e 15°C. À temperatura de 15°C, em comparação com 35°C e 25°C, houve perda significativa da motilidade de 10%, enquanto a integridade do acrossomo permaneceu inalterada. Após resfriamento até 5°C houve queda significativa tanto da motilidade quanto da integridade do acrossomo<sup>16</sup>.

Perezcano-Fernandes<sup>8</sup> demonstrou que após 2, 24 e

48 horas a motilidade e a NAR de sêmen diluído com Androhep e BTS são altamente significantes, assim como de 0 até 24 horas para BTS e de 24 até 48 horas para Androhep<sup>14</sup>.

#### Influência da incubação antes da refrigeração

Weber<sup>16</sup> constatou que a incubação do sêmen a 15°C acarreta perda estatisticamente significativa da motilidade em cerca de 20%, em relação à incubação de três horas a 35°C.

A incubação de quatro horas a 25°C nos meios de diluição Androhep 0\*, BW 15\*\* e Androhep\*\*\* melhora sensivelmente a motilidade e a integridade do acrossomo do espermatozóide de suíno.

Após seis e oito horas de incubação a 20°C, a motilidade espermática é altamente significativa em relação às amostras resfriadas a 5°C e não incubadas e às resfriadas e incubadas

\*Androhe 0 = Glucose - Critato - EDTA-HEPES

\*\*BW15 = Glucose - Citrato - EDTA - MOPS- BSA

\*\*\*Androhep = Glucose - Citrato - EDTA - HEPES - BSA

durante duas horas. Entre as temperaturas de resfriamento de 20°C e 5°C, há diferenças significantes na motilidade espermática em todos os intervalos de incubação.

A motilidade de sêmen incubado (25°C, 20°C e 15°C) e resfriado a 5°C independe significativamente da temperatura de incubação em relação às não-incubadas<sup>16</sup>.

### Influência da incubação antes do choque frio

O sêmen de suíno é extremamente sensível ao choque frio após a ejaculação, entretanto, adquire certa resistência pela incubação, conforme demonstrado por Lasley; Bobart<sup>5</sup> e Benson *et al.*<sup>1</sup>. Estudos desenvolvidos por Pursel *et al.*<sup>8,10,11</sup> e por Buttler; Roberts<sup>2</sup> demonstraram que a incubação de quatro até sete horas a 30°C aumentou a resistência ao choque frio, pois 70 a 80% dos espermatozoides não mostraram alterações na motilidade nem na integridade do acrossomo.

A velocidade e o intervalo de refrigeração têm grande significado nas alterações causadas pelo choque frio. Segundo Watson<sup>15</sup>, há efeito do choque frio sobre as células espermáticas, a partir da velocidade de refrigeração de 10 até 15°C por minuto. Os espermatozoides de suínos oriundos do ejaculado completo são irreversivelmente comprometidos após a refrigeração de 37°C a 5 até 0°C, independentemente da velocidade de refrigeração, enquanto espermatozoides oriundos da fração rica do sêmen sobrevivem à refrigeração. Moore *et*

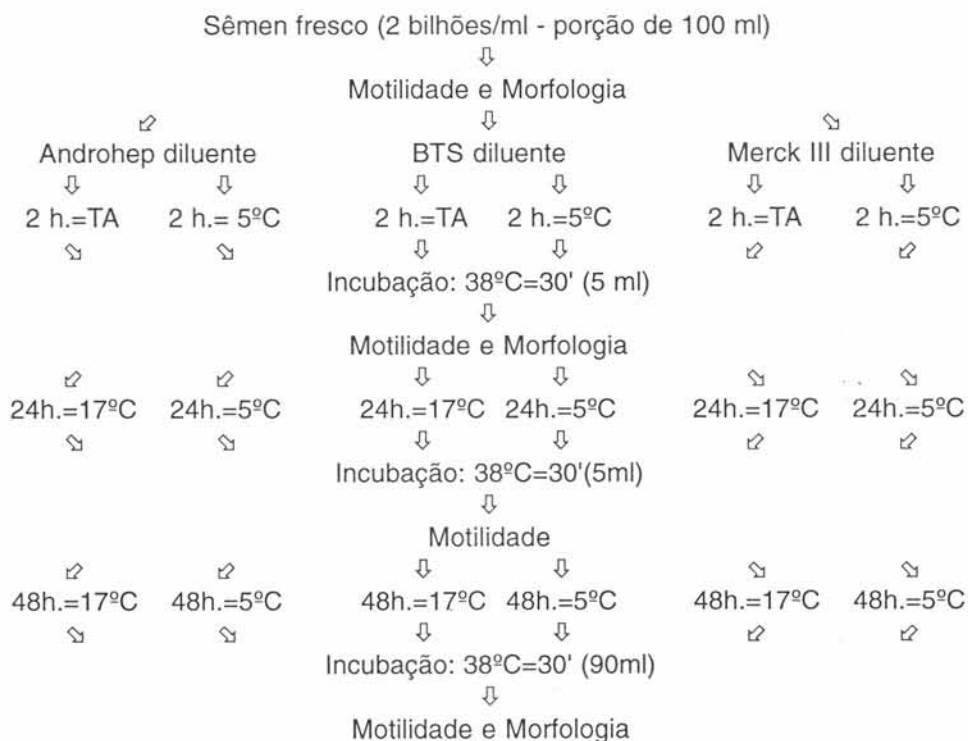
*al.*<sup>6</sup> e Nath *et al.*<sup>7</sup> estudaram a qualidade do sêmen de suíno após três diferentes períodos de equilíbrio a 24°C. Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi mantido a 24°C e após 1, 2 ou 3 horas foi centrifugado, ressuspendido e resfriado de 24°C a 5°C durante 1,5 hora. Após a refrigeração a 5°C, o sêmen foi congelado. A motilidade e a integridade do acrossomo do sêmen mantido por 2 ou 3 horas antes da congelação foram significativamente melhores que daquele mantido por uma hora a 24°C antes da congelação.

Investigações sobre a influência da incubação (resistência) do espermatozoide antes do choque frio foram também conduzidas por Watson<sup>15</sup>. Espermatozoides não diluídos foram incubados a 20°C por 2, 4, 8, 16, 24 ou 32 horas e então induzidos ao choque frio a 0°C. A maior parte dos espermatozoides sobreviveu ao choque frio nos intervalos entre 4 e 16 horas de incubação, havendo queda do número de acrossomos intactos após 32 horas de incubação. Este estudo demonstrou que a incubação de 16 horas à temperatura ambiente após a ejaculação aumenta significativamente a resistência ao choque frio. Os autores afirmaram que intervalo longo de incubação antes da refrigeração tem efeito positivo sobre o processo de criopreservação, pois a membrana adquire maior resistência contra o choque frio.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de diferentes diluentes e temperaturas sobre a qualidade do sêmen

Figura 1

Etapas experimentais do sêmen de suínos conservado a fresco



suíno. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a motilidade do ejaculado nativo e aqueles diluídos nos três diferentes diluentes. Isto significa que logo em seguida à diluição tais diluentes têm a mesma influência sobre a motilidade e a integridade do acrossomo do sêmen suíno.

## MATERIAL E MÉTODO

### Colheita, exame e diluição do sêmen

Para a diluição e a refrigeração do sêmen foram utilizados 6 cachuchos das raças Landrace alemão e Schwäbisch-hällischen, sendo o experimento realizado entre janeiro e fevereiro de 1995 no Instituto de Medicina da Reprodução da Escola Superior de Veterinária de Hannover. A colheita do sêmen foi realizada pelo método da mão enluvada com ajuda de Phantome. O sêmen das fases rica e da pobre foi colhido em vidros separados, pré-aquecidos a 35°C e a secreção das glândulas bulbouretrais foi separada por gaze estéril. Após a colheita, o ejaculado permaneceu por 15 minutos a 32°C em banho-maria para adaptação à temperatura do diluente. O sêmen foi avaliado quanto à aparência, volume, concentração, motilidade e morfologia<sup>4</sup>.

Em seguida, o ejaculado foi fracionado em porções de 100 ml (2 bilhões/ml) e diluído com Androhep, BTS e Merck III, na proporção de 1 + 1. Componentes do diluente Androhep:

D (+) Glucose	26,0g
Tri-Natriumcitrat-2hydrat	8,0g
Natriumhydrocarbonat	1,2g
BSA	2,4g
HEPES	2,5g
Gentamycin	0,25g
Aqua bidest	ad 1.000 ml

Componentes do diluente BTS:

D (+) - Glucose	37,0g
Tri-Natriumcitrat-2hydrat	6,0g
Natriumhydrocarbonat	1,3g
EDTA	1,3g
KCL	0,80g
Gentamycin	0,25g
Aqua bidest.	ad 1.000 ml

Componentes do diluente Merck III:

D (+) - Glucose (monohydrat)	52,7g
Tri-Natriumcitrat-2hydrat	3,3g
EDTA	1,8g
Natriumhydrocarbonat	1,2g
Neomycinsulfat	1,0g
Aqua bidest.	ad 1.000 ml

Cada porção foi conservada durante 2 horas em temperaturas de 20°C ou 5°C. De cada porção foram retirados e incubados 5 ml de sêmen durante 30 minutos a 38°C e

realizado o segundo exame morfológico (NAR) e de motilidade.

As porções conservadas em temperatura ambiente (TA = 20°C) foram mantidas a 17°C por mais 24 horas, enquanto as conservadas a 5°C foram mantidas nesta temperatura por mais 24 horas. Estas amostras foram incubadas por 30 minutos a 38°C e, em seguida, realizado o terceiro exame de motilidade.

As porções conservadas foram mantidas nas mesmas temperaturas (17°C e 5°C) por mais 48 horas e, em seguida, incubadas a 38°C durante 30 minutos, sendo realizada a última avaliação da motilidade e integridade do acrossomo.

A refrigeração das diferentes amostras foi medida por termômetro eletrônico (Therm Typ 2280-8, Fa. Minitüb - from - 200,0 until + 600,0°C) pela introdução do eletrodo no sêmen, conforme mostra graficamente a Fig. 1).

### Avaliação estatística

As variáveis "SMOT, CMOT e NAR" foram calculadas segundo o procedimento General Linear Models "GLM" (SAS 1985). Para a variância significativa ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas através do teste t de Student.

## RESULTADOS

Na Tab. 1, são ilustradas a influência dos diferentes diluentes e das temperaturas sobre a motilidade do sêmen de suínos. A motilidade das amostras de sêmen nativo diluído em Androhep, BTS e Merck III não difere significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). Tanto após 2 horas a 20°C e a 5°C quanto após 24 horas a 17°C e 5°C e após 48 horas a 17° e 5°C, as amostras diluídas em Androhep e BTS não mostraram diferença significante entre si ( $p < 0,05$ ), entretanto, foram significativamente melhores em relação às diluídas em Merck III.

Na Tab. 2, são ilustradas a influência dos diferentes diluentes e das temperaturas sobre a integridade do acrossomo - normal apical rand (NAR). A NAR do sêmen nativo e o sêmen após 2 horas a 20°C diluídos em Androhep, BTS e Merck III não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). Após 48 horas, as amostras de sêmen conservadas a 17°C também não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) e aquelas diluídas em Androhep e BTS e conservadas a 5°C, não diferem significativamente daquelas diluídas em Merck III ( $p < 0,05$ ).

### Comportamento da temperatura durante a refrigeração

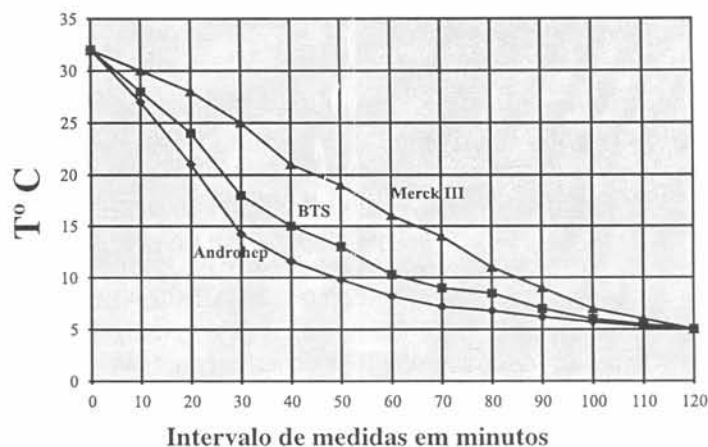
Na Fig. 2 está representada a curva de refrigeração das amostras de sêmen diluídas em Androhep na proporção 1+1. A diluição mostrou diferenças na duração da refrigeração, desde o ponto inicial do refrigeração (32°C) até o ponto final (15°C).

As porções diluídas em Merck III sofreram refrigeração mais rápida que aquelas diluídas em Androhep e BTS. Entre os 70 e 120 minutos houve refrigeração linear nos diluentes Androhep e BTS até atingir o limite de 5°C.

## DISCUSSÃO

Pode-se observar nas Tab. 1 e 2 que na refrigeração lenta (32°C ⇒ 20°C ⇒ 17°C ⇒ 5°C) houve maior aumento da motilidade ( $p < 0,05$ ) e do NAR que na refrigeração rápida (32°C ⇒ 5°C). Estes resultados mostram que o sêmen de suínos é muito sensível ao choque frio, conforme observações de Weber<sup>16</sup>; Nath<sup>7</sup> e Tamuli; Watson<sup>13</sup>. A motilidade e NAR dos espermatozoides resfriados a 5°C são significativamente mais baixas em relação às amostras resfriadas a temperaturas de 25°C e 15°C<sup>16</sup>.

O aumento significativo da motilidade e NAR do



**Figura 2**

Curvas de refrigeração de 100 ml de sêmen suíno (2 bilhões/ml) diluídos em Androhep, BTS e Merck III.

**Tabela 1**

Influência dos diferentes diluentes e temperaturas sobre a motilidade do sêmen de suínos.

Diluyente (Ejaculado)	Fresco %	2h=20°C %	2h=5°C %	24h=17°C %	24h=5°C %	48h=17°C %	48h=5°C %
Androh. (6)	90	85 <sup>a</sup>	74 <sup>c</sup>	80 <sup>e</sup>	60 <sup>g</sup>	75 <sup>i</sup>	42 <sup>l</sup>
BTS (6)	90	85 <sup>a</sup>	65 <sup>c</sup>	75 <sup>e</sup>	54 <sup>g</sup>	70 <sup>i</sup>	42 <sup>l</sup>
Merck III (6)	90	85 <sup>b</sup>	55 <sup>d</sup>	68 <sup>f</sup>	42 <sup>h</sup>	61 <sup>j</sup>	28 <sup>m</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si significativamente ( $p < 0,05$ ).

Institut für Reproduktionsmedizin - Tierärztliche Hochschule Hannover - janeiro/fevereiro 1995.

**Tabela 2**

Influência dos diferentes diluentes e temperaturas sobre a integridade do acrossomo (NAR) do sêmen de suínos.

Diluyente (Ejaculado)	Fresco %	2h=20°C %	2h=5°C %	48h=17°C %	48h=5°C %
Androh. (6)	91,4	89,7 <sup>a</sup>	86,7 <sup>b</sup>	85,5 <sup>c</sup>	73,2 <sup>d</sup>
BTS (6)	91,4	89,4 <sup>a</sup>	85,4 <sup>b</sup>	84,8 <sup>c</sup>	72,7 <sup>d</sup>
Merck III (6)	91,4	88,4 <sup>a</sup>	84,5 <sup>b</sup>	83,9 <sup>c</sup>	62,7 <sup>e</sup>

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si significativamente ( $p < 0,05$ ).

Institut für Reproduktionsmedizin - Tierärztliche Hochschule Hannover - janeiro / fevereiro 1995.

sêmen diluído em Androhep e BTS após 2, 24 e 48 horas são resultados idênticos aos encontrados por Perezcanto-Fernandes<sup>8</sup> e após 0 até 24 horas diluídos em BTS e 24 até 48 horas diluídos em Androhep<sup>14</sup>.

A refrigeração do sêmen diluído em Androhep (Fig.2) mostra que o rápido resfriamento das porções diluídas em Merck III, provavelmente, influenciou negativamente sobre a qualidade do sêmen. Uma comparação destes resultados de refrigeração com outros autores se torna difícil, pelo

fato de terem medido apenas a velocidade de congelação do sêmen<sup>3,12</sup>.

## CONCLUSÕES

1. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diluentes Androhep e BTS, entretanto, o diluente Merck III influenciou negativamente sobre a qualidade do sêmen suíno;

2. A refrigeração lenta mostrou aumento mais significativo da motilidade e do NAR que a refrigeração rápida.



## SUMMARY

Six ejaculates were collected from six different boars for dilution with Androhep, BTS and Merck III and cooling in different temperatures. After examination (appearance, volume, motility, concentration and morphology of acrosomal ridges [NAR]) the semen was in 100 ml fragmented (2 bi./ml) and dilutes (1+1). The fractions were slowly ( $32^{\circ}\text{C} \Rightarrow 20^{\circ}\text{C} \Rightarrow 17^{\circ}\text{C} \Rightarrow 5^{\circ}\text{C}$ ) or rapidly ( $32^{\circ}\text{C} \Rightarrow 5^{\circ}\text{C}$ ) cooling for 2, 24 or 48 hours. After this period 5 ml semen were for 30 min by  $38^{\circ}\text{C}$  incubated and examined. The cooling of the different fractions was measured in the semen with an electronic thermometer (Therm Typ 2280-8, Fa. Minitüb - from  $-200,0$  until  $+600,0^{\circ}\text{C}$ ). The slow cooling showed a visible motility increase ( $p < 0.05$ ) and acrome integrity (NAR) than the rapid cooling. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between Androhep and BTS dilute, but the Merck III dilute has a bad influence on the quality of boar semen.

**UNITERMS:** Diluents; Pigs; Refrigeration.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BENSON, R.H.; PICKETT, B.W.; KOMAREK, R.J.; LUCAS, J.J. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to liquid content. *Journal Animal Science*, v.26, p.1078-81, 1967.
- 2- BUTLER, W.J.; ROBERTS, T.K. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *Journal Reproduction Fertility*, v.43, p.183-7, 1975.
- 3- FISER, P.S. Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol. 2nd Int. Conf. on Boar Semen Preservation, Beltsville 1990, *Reproduction Domestic Animal Supplement*, v.1, p.123-37, 1990.
- 4- KRAUSE, D. *Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde*. Hannover, 1996. (Habilitation- Schrift). Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 5- LASLEY, J.F.; BOBART, R. Some factors affecting the resistance of ejaculated and epididymal spermatozoa of the boar to different environmental conditions. *American Journal Physiology*, v.141, p.619-24, 1944.
- 6- MOORE, H.D.M.; HALL, G.A.; HIBBITT, K.G. Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. *Journal of Fertility*, p.39-45, 1976.
- 7- NATH, M.C.; DEKA, B.C.; BORGHAIN, B.N. Effect of holding time on quality of frozen boar semen. *Indian Veterinary Journal*, v.71, p.250-2, 1994.
- 8- PEREZCANTO-FERNANDEZ, J. Tiefgefrierung von Ebersamen in Kunststoffrohren. Einführung des Verfahrens an einer Schweinebesamung; in vitro- Untersuchungen zur Nachverdünnerzusammensetzung und zum Auftauverfahren sowie Befruchtungsergebnisse nach Einsatz zweier Nachverdünner und der hormonellen Brunstinduktion. Hannover, 1978. (Dissertation). Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- 9- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar incubated before cold shock. *Journal Animal Science*, v.34, p.278-83, 1972a.
- 10- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal Animal Science*, v.35, p.580-4, 1972b.
- 11- 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 Animal Science* v.37, p.528-31, 1973.
- 12- SIMMET, C. *Kältephysikalische Aspekte der Gefrierkonservierung von Ebersperma in ihrer Auswirkung auf Samenqualität und Befruchtungsrate*. Hannover, 1993. (Dissertation). Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- 13- TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Veterinary Record*, v.135, n.7, p.160-2, 1994.
- 14- WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; LIETMANN, C.; LÜBBERT ZUR LAGE, W.; BORTOLOZZO, F.P.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pré- and postovulatory insemination. *Theriogenology*, v.41, p.1367-77, 1994.
- 15- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORAIS, G.J.; CLARKE, A. (Hrsg): *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press, London, p.189-218, 1981.
- 16- WEBER, H. Zur Kälteschockempfindlichkeit von Eberserminen: Einfluß von Verdünnermedium, Inkubation und Abkühlrate. Hannover, 1989. (Dissertation). Tierärztliche Hochschule, Hannover.

Recebido para publicação: 31/03/1998  
Aprovado para publicação: 26/02/1999