

**LONGEVIDADE DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO, INCUBADO EM  
DIFERENTES TEMPOS E TEMPERATURAS DE EQUILÍBRIO**  
(*Longevity of swine sperm, incubated in different times and equilibrium temperatures*)

Ricardo Toniolli<sup>1</sup>; Faviano Ricelli da Costa Moreira<sup>2</sup>; Luciana de Souza Toniolli<sup>3</sup>; Tatyane  
Bandeira Barros<sup>3</sup>; Daianny Barbosa Guimarães<sup>3</sup>; Lina Raquel Santos Araújo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen (LRSTS) / UECE; <sup>2</sup>Instituto Federal de Educação  
Tecnológica do Rio Grande do Norte, Ipangaçu-RN; <sup>3</sup>Bolsistas IC-LRSTS. Av. Dr. Silas Munguba, 1700º -  
Campus Itaperi, Fortaleza-Ce. CEP: 60.740-000.

**RESUMO**

Os espermatozoides suínos apresentam sensibilidade às variações de temperaturas, devido à composição lipídica de sua membrana plasmática. Períodos de incubação prévia podem afetar a fluidez da membrana, proporcionando ao espermatozoide uma melhor resistência, além de prolongar o período de armazenamento do sêmen e aumentar a proporção de espermatozoides com acrossoma intacto. O presente trabalho objetivou identificar a melhor relação entre temperatura e tempo de incubação do sêmen suíno diluído. Foram utilizados 57 ejaculados, provenientes de seis varrões, divididos em cinco tratamentos: **T1** (controle): Sêmen diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS) (35 °C) → 17 °C (7 dias); **T2**: Sêmen diluído (35 °C) → 30 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); **T3**: Sêmen diluído (35 °C) → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); **T4**: Sêmen diluído (35 °C) → 30 °C/1 hora → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); **T5**: Sêmen diluído (35 °C) → 30 °C/1 hora → 25 °C/1 hora → 20 °C/4 horas → 17 °C (7 dias). No dia da coleta, nas primeiras 8 horas, não foram observadas diferenças entre os tratamentos, quanto ao vigor e motilidade ( $p>0,05$ ). No período de conservação (0 a 7 dias), no D0, os valores de vigor e motilidade do T5 foram superiores ao T1 ( $p<0,05$ ), e no D5 o T1 foi superior ao T5, em relação aos mesmos parâmetros ( $p<0,05$ ). Já em relação ao percentual de acrossomas morfológicamente normais, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ( $p>0,05$ ), apenas entre o sêmen pós-diluição e T3, T4 e T5 ( $p<0,05$ ). Portanto, concluiu-se que a incubação prévia não aumentou o tempo de conservação do sêmen, bem como não trouxe prejuízos, durante sua conservação.

**Palavras-chave:** Conservação, sêmen, incubação, refrigeração.

**ABSTRACT**

The swine spermatozoa are more sensitive to temperature variations due to the lipid composition of their plasma membrane. Incubation periods can affect the membrane fluidity, providing better resistance to sperm, in addition to prolonging the period of semen storage and also can increase the proportion of spermatozoa with an intact acrosome. This study aimed to identify the best relation between temperature and incubation time of diluted swine semen.

---

\*Endereço para correspondência:  
ricardo.toniolli@uece.br

There were used 57 ejaculates from 6 boars divided into 05 treatments: T1 (control): Semen diluted in Beltsville Diluted semen (35 ° C) → 30 ° C / 1 hour → 25 ° C / 4 hours → 17 ° C (7 days); T5: Diluted semen (35 ° C) → 30 ° C / 1 hour → 25 ° C / 1 hour → 20 ° C / 4 hours → 17 ° C (7 days). On Thawing Solution (BTS) at 35 ° C → 17 ° C (7 days); T2: Diluted semen (35 ° C) → 30 ° C / 4 hours → 17 ° C (7 days); T3: Diluted semen (35 ° C) → 25 ° C / 4 hours → 17 ° C (7 days); T4: the day of collection, in the first 8 hours weren't observed differences between treatments ( $p > 0.05$ ). In D0, values of vigor and motility of T5 were higher than T1 ( $p < 0.05$ ), and in D5 T1 was higher than T5 in relation to the same parameters ( $p < 0.05$ ). There were no differences between treatments ( $p > 0.05$ ), only between post-dilution semen and T3, T4 and T5 ( $P < 0.05$ ). Therefore, it was concluded that the previous incubation did not increase the storage time of the semen and did not bring losses during its conservation. There were statically analyzed: vigor, motility (Mann-Whitney), where in DO, T5 was superior to T1 ( $p < 0.05$ ), and in D5 and D9, T1 was superior to T5 ( $p < 0.05$ ), and morphology ("t" of Student Test), where there were not any differences between treatments. In all treatments, were found differences between pure semen and the diluted, and between the diluted and the following analyses ( $p < 0.05$ ). Therefore, conclusions is that incubation didn't increase the time of semen preservation and that dilution moment is the most critical in the cooling process of the cooled semen.

**Key Words:** Conservation, semen, incubation, cooling.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a aplicação de biotécnicas vem trazendo avanços consideráveis para a reprodução de diversas espécies animais (OLIVEIRA, 2007). A suinocultura moderna e tecnificada, cada vez mais, utiliza a inseminação artificial (IA) como componente do manejo reprodutivo (BORTOLOZZO *et al.*, 2005; RIESENECK, 2011). A redução da temperatura para posterior utilização do sêmen em programas de IA tem sido o método mais utilizado para prolongar a viabilidade dos espermatozoides (sptz). Como as células espermáticas são sensíveis ao choque térmico, temperaturas inferiores a 15 ° C levam a uma perda significativa no número de espermatozoides viáveis (ALTHOUSE *et al.*, 1998; SCHULZE *et al.*, 2015).

Acredita-se que a sensibilidade ao frio está relacionada à composição lipídica da membrana plasmática, por afetar sua fluidez (SCHULZE *et al.*, 2013). Com a queda da temperatura, ocorre uma restrição nos movimentos dos fosfolipídios da membrana, podendo resultar na transição da fase de fluido para a fase gel (ALTHOUSE *et al.*, 1998). Variações de acordo com o tempo e temperatura de resfriamento possibilitam ao espermatozoide a aquisição de um grau significativo de resistência ao choque térmico, após sua manutenção à temperatura ambiente, antes de ser submetido ao resfriamento (JOHNSON *et al.*, 2000). Aproximadamente, 4 a 7 horas após a ejaculação, 50-80% das células espermáticas adquirem resistência, a julgar por

sua motilidade e morfologia, influenciadas pelo pH e composição do diluente (PURSEL e JOHNSON, 1970; PURSEL *et al.*, 1972, 1973b).

O período de incubação do sêmen, após a coleta, também é utilizado nas centrais de inseminação artificial de suínos, a fim de melhorar os índices de fertilidade com o sêmen resfriado entre 15 e 18 °C, bem como na tentativa de prolongar o tempo de armazenamento do ejaculado. Tem sido relatado, ainda, que a incubação prévia do sêmen em temperaturas acima de 15 °C, pode aumentar a viabilidade do sêmen armazenado em temperaturas abaixo de 15 °C (PURSEL *et al.*, 1973a; KATZER, 2009; KATZER *et al.*, 2001a e 2001b). O tempo de incubação também aumenta a proporção dos espermatozoides com acrossoma intacto, tanto a 15 quanto a 5 °C, quando comparados com células sem incubação prévia (MAXWELL e JOHNSON, 1997). O presente trabalho teve por objetivo identificar qual a melhor relação entre temperatura e tempo de estabilização do sêmen suíno diluído, visando a melhor preservação da qualidade espermática, bem como, verificar quais as faixas de temperatura de maior sensibilidade para o espermatozoide suíno.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reprodutores e coleta de sêmen

Foram utilizados seis animais, pertencentes ao LRSTS/FAVET/UECE, sendo três reprodutores puros (dois Duroc e um Landrace) e três híbridos (dois Dalland e um Agroceres), com idade variando entre 1,5 e 2,5 anos, mantidos em baias convencionais para reprodutores. Os ejaculados foram coletados pela técnica da mão enluvada, em recipiente com capacidade de 400 mL, coberto por gaze e protegido em copo térmico de coleta (JOHNSON *et al.*, 2000). Os machos encontravam-se em sistema rotineiro de coleta semanal, sendo alimentados com ração balanceada de boa qualidade, com os níveis proteicos, energéticos e minerais dentro dos padrões estipulados para reprodutores em sistema de trabalho (3.150 Kcal/Kg e 14% de PB; 2,5 Kg/dia de ração/dia divididos em dois arraçoamentos). Foi utilizado o ejaculado total de cada varrão, após a separação da parte gelatinosa através de gaze no copo de coleta, colocado em proteção térmica, sendo identificado após coleta e levado ao laboratório para o seu processamento.

### **Avaliação da qualidade espermática do sêmen *in natura***

A qualidade do ejaculado foi estabelecida através do seu aspecto, volume (em balança digital), concentração (em espectrofotômetro), total de células, vigor espermático (variando de 0 a 5) (TONIOLLI, 1996) e percentual de células móveis (variando de 0 a 100%) (MARTIN RILLO *et al.*, 1996). Para o exame dessas duas últimas características, uma amostra do sêmen puro (15 $\mu$ L) foi colocada entre lâmina e lamínula e feita a leitura em microscopia óptica, com um aumento de 200 vezes, sendo avaliados, para cada característica, pelo menos três campos de microscópio. Apenas os ejaculados com vigor  $\geq 3,0$  e motilidade  $\geq 70\%$  (CBRA, 2013) foram utilizados no experimento.

### **Conservação e frequência de análises do sêmen**

Foram utilizados 57 ejaculados, retirando-se de cada um deles um total de  $3,08 \times 10^9$  spz, divididos entre os 5 diferentes tratamentos ( $875 \times 10^6$  spz/tratamento), sendo repartidos em 07 tubos de ensaio (1 tubo/dia de análise), contendo um total de  $87,5 \times 10^6$  spz/tubo em 2,5 mL de volume (dilúente mais sêmen). As diluições foram feitas, respeitando-se uma concentração de  $35 \times 10^6$  spz/mL. Cada ejaculado foi distribuído por todos os tratamentos, repartidos entre sete tubos de ensaio, fechados com tampa plástica, que correspondem, individualmente, a cada um dos dias de análise. Estes tubos foram conservados em geladeira a uma temperatura entre 15 a 17 °C, durante todo período de conservação (7 dias).

No dia da coleta, após diluição, o sêmen foi analisado (vigor e motilidade) em intervalos de 60 minutos até 8 horas de conservação, retirando-se uma alíquota de cada tratamento, reaquecida a 37 °C/10 minutos, antes das análises. A cada dia, foram retirados os tubos de ensaio equivalentes a cada macho, em cada tratamento, para serem incubados a 37 °C por 10 minutos, para posteriores análises. Desta forma, cada ejaculado foi testado a cada dia de conservação e em cada tratamento. O dia da coleta foi considerado dia zero (D0), sendo o sêmen conservado até 7 dias após a coleta (D7), com análises diárias: D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6 e D7. Para as análises de morfologia, foram utilizadas amostras provenientes dos ejaculados, nos dias D0, D4 e D7. As análises em D0 foram feitas, após 6 horas de conservação do sêmen a 17 °C.

## **Tratamentos – Curvas de resfriamento do sêmen**

O ejaculado de cada reprodutor, após coleta, foi repartido nos 5 tratamentos, a seguir:

**T1** - Sêmen diluído em BTS a 35 °C e, após, conservado a 17 °C (Controle);

**T2** - Sêmen diluído em BTS a 35 °C, incubado a 30 °C/4h e, após, conservado a 17 °C;

**T3** - Sêmen diluído em BTS a 35 °C, incubado a 25 °C/4h e, após, conservado a 17 °C;

**T4** - Sêmen diluído em BTS a 35 °C, incubado a 30 °C/1h; em seguida a 25 °C/4h e, após, conservado a 17 °C;

**T5** - Sêmen diluído em BTS a 35 °C, incubado a 30 °C/1h e a 25°C/1h; em seguida a 20 °C/4h e, após, conservado a 17 °C.

Entre as reduções de temperatura (T4 e T5), considerou-se o tempo de 1 hora, para que o ejaculado chegasse à temperatura desejada, contando-se a partir daí o real tempo de incubação. Cada ejaculado foi diluído e conservado à temperatura final de 17 °C (PURSEL *et al.*, 1973a).

## **Análises do sêmen pós-diluição**

Para a avaliação das características de vigor e motilidade espermática (% espermatozoides móveis), o sêmen foi incubado em “banho-maria”, a 37 °C e as leituras foram feitas após 10 minutos de incubação.

Com a finalidade de se proceder ao exame morfológico, foi feito um esfregaço de sêmen corado pela solução de azul de bromo-fenol, contando 200 células por amostra. Os exames foram feitos através da microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 1000x e analisou-se a porcentagem de espermatozoides com acrossoma normal (NAR) (KUMUS, 1993). A solução corante foi formada por: 0,1g de azul de bromo-fenol; 0,4g de citrato de sódio e 100mL de água destilada. Uma gota de sêmen foi colocada sobre a lâmina, após 30 segundos foi misturada à outra gota (30 µL) da solução corante, para se preparar o esfregaço, que secou à temperatura ambiente, antes da análise.

## **Análise Estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso. As médias foram submetidas à Análise de Variância, utilizando-se o General Linear Models do programa

Statistical Analysis System (SAS 6.03). A análise estatística foi feita, através dos testes de Mann-Whitney, para vigor espermático e do Qui-quadrado, para as variáveis motilidade espermática e NAR, sendo utilizado um intervalo de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliações no dia da coleta (D0)

Com relação às avaliações durante o dia de coleta para o vigor espermático, como pode ser observado na Tab. 01, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, em todos os horários analisados ( $p > 0,05$ ). As diferenças ocorreram, quando foram comparados diferentes momentos dentro de cada tratamento, como no T4, onde a única diferença significativa encontrada foi entre o sêmen analisado a 1 hora (2,2) e às 5 horas (2,5) de incubação ( $p < 0,05$ ). O que se observou, independente do tratamento, foram quedas significativas da qualidade do ejaculado entre o sêmen puro (4,5), o recém diluído (3,0) e os valores durante a incubação, nos diferentes momentos de análises subsequentes (1h, ..., 8h) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 01:** Avaliação do vigor espermático do ejaculado suíno durante o dia de coleta (D0), analisado sequencialmente, durante 8 horas pós-coleta.

<i>In natura</i>	Recém diluído	Tratam.	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	
4,5 <sup>A</sup>	3,0 <sup>B</sup>	<b>T1</b>	2,3 <sup>C</sup>	2,2 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,5 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	
		<b>T2</b>	2,2 <sup>C</sup>	2,2 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>
		<b>T3</b>	2,2 <sup>C</sup>	2,2 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>	2,3 <sup>C</sup>
		<b>T4</b>	2,2 <sup>C</sup>	2,2 <sup>CD</sup>	2,4 <sup>CD</sup>	2,4 <sup>CD</sup>	2,5 <sup>D</sup>	2,4 <sup>CD</sup>	2,4 <sup>CD</sup>	2,4 <sup>CD</sup>	2,3 <sup>CD</sup>
		<b>T5</b>	2,1 <sup>C</sup>	2,2 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>	2,4 <sup>C</sup>

<sup>A,B,C,D</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre horas de conservação pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ); T1 (controle) = 35 °C → 17 °C (7 dias); T2= 35 °C → 30 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T3= 35 °C → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T4= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T5= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/1 hora → 20 °C/4 horas → 17 °C (7 dias).

O comportamento dos ejaculados para a característica da motilidade espermática (Tab. 02) também não diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em todas as horas analisadas. Mais uma vez, as diferenças ocorreram dentro de cada tratamento (1 e 5), em relação aos momentos analisados. No T1, as diferenças ocorreram de maneira significativa, apenas entre as análises efetuadas na 5<sup>a</sup> hora (54%) e na 2<sup>a</sup> hora pós-diluição (47%) ( $p < 0,05$ ). Para esta

característica, também foi observado, independente do tratamento, quedas significativas da qualidade do ejaculado entre o sêmen puro (94%), o recém diluído (68%) e nos diferentes momentos de análises subsequentes (1h, ..., 8h) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 02:** Avaliação da motilidade espermática do ejaculado suíno durante o dia de coleta (D0) analisado seqüencialmente durante 8 horas pós-coleta.

<i>In natura</i>	Recém diluído	Tratam.	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h
94 <sup>A</sup>	68 <sup>B</sup>	T1	51 <sup>CD</sup>	47 <sup>C</sup>	51 <sup>CD</sup>	51 <sup>CD</sup>	54 <sup>D</sup>	51 <sup>CD</sup>	53 <sup>CD</sup>	50 <sup>CD</sup>
		T2	48 <sup>C</sup>	48 <sup>C</sup>	52 <sup>C</sup>	50 <sup>C</sup>	51 <sup>C</sup>	51 <sup>C</sup>	50 <sup>C</sup>	51 <sup>C</sup>
		T3	48 <sup>C</sup>	49 <sup>C</sup>	50 <sup>C</sup>	49 <sup>C</sup>	50 <sup>C</sup>	53 <sup>C</sup>	50 <sup>C</sup>	48 <sup>C</sup>
		T4	48 <sup>C</sup>	49 <sup>C</sup>	52 <sup>C</sup>	51 <sup>C</sup>	55 <sup>C</sup>	54 <sup>C</sup>	52 <sup>C</sup>	51 <sup>C</sup>
		T5	48 <sup>C</sup>	48 <sup>C</sup>	52 <sup>C</sup>	50 <sup>C</sup>	53 <sup>C</sup>	52 <sup>C</sup>	53 <sup>C</sup>	53 <sup>C</sup>

<sup>A,B,C,D</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre horas de conservação pelo Teste do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ); T1 (controle) = 35 °C → 17 °C (7 dias); T2= 35 °C → 30 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T3= 35 °C → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T4= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T5= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/1 hora → 20 °C/4 horas → 17 °C (7 dias).

Segundo Almeida (2014), durante o processamento das doses inseminantes a diminuição da temperatura deve ocorrer de forma contínua e gradual, com o objetivo de aumentar a resistência da membrana plasmática dos espermatozoides contra o choque térmico e reduzir os danos às células espermáticas. Por esse motivo, as Centrais de Processamento de Sêmen normalmente utilizam o protocolo de diluição isotérmica com uma ou duas etapas de diluição, passando por um período à temperatura ambiente (24 °C), para depois serem estocadas a 17 °C (LÓPEZ RODRIGUEZ *et al.*, 2011; MAES *et al.*, 2011). Assim, as doses inseminantes alcançam, dentro de três horas, a temperatura de armazenamento convencional (ALMEIDA, 2014). Porém, neste estudo, o sêmen estocado diretamente a 17 °C (T1) estaria alcançando a temperatura de conservação, já na 2<sup>a</sup> hora de armazenamento, ocasionando uma redução momentânea da motilidade, devido a rearranjos sofridos na de membrana plasmática, como forma de adaptação a temperaturas mais baixas (ALTHOUSE *et al.*, 1998; GUIMARÃES *et al.*, 2018). Já as diferenças observadas no T4, em relação ao vigor espermático, podem estar relacionadas à lenta curva de resfriamento que, diferentemente dos demais tratamentos, na 5<sup>a</sup> hora de incubação, o sêmen ainda estaria a 25 °C, apresentando uma faixa metabólica mais alta.

Para obtenção do efeito protetor sobre as células espermáticas, a temperatura do diluente desempenha um papel bastante importante, bem como a escolha do diluente. Segundo Schulze *et al.* (2013), mesmo em condições isotérmicas, os danos hipotérmicos da diluição foram

mais pronunciados no BTS, quando comparados a diluentes de longa duração. Dessa forma, neste estudo, o BTS não conferiu a proteção esperada para as células espermáticas, resultando em redução do vigor e da motilidade do sêmen suíno, por ocasião da diluição e da 1ª hora de conservação ou incubação, discordando do observado por outros autores (CASTELO, 2010; ALKMIM *et al.*, 2011; LALRINTLUANGA *et al.*, 2016).

Segundo Lima *et al.* (2010), quedas abruptas da temperatura de pré-resfriamento (-1,4 °C), provocam redução mais acentuada da motilidade espermática. Por outro lado, Katzer (2009) observou que incubação prévia ou a queda lenta da temperatura diminuem a sensibilidade do sêmen suíno ao resfriamento a baixas temperaturas (5 °C); entretanto, quando armazenado a 17 °C, a incubação prévia não produz efeitos sobre os parâmetros de vigor e motilidade, conforme observado no presente estudo, nas primeiras horas de análise.

### Efeito do período de conservação

Nos resultados apresentados na Tab. 03, referentes ao vigor espermático, os diversos tratamentos mostram comportamento semelhante em todos os dias de conservação do sêmen, com exceção de D0 e D5. No D0, o único tratamento que apresentou diferença estatística, em relação ao T1 (controle - 2,2) foi o T5 (2,5) ( $p < 0,05$ ). Esse tipo de comportamento não foi mantido entre D1 e D4, nem entre D6 e D7; ou seja, os tratamentos não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Contudo, no D5, houve uma inversão entre os tratamentos com melhores resultados, com T1 melhor em relação ao T5 (1,9 vs. 1,5) ( $p < 0,05$ ), não havendo diferenças entre os demais tratamentos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 03:** Vigor espermático do sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 7 dias consecutivos.

<i>In natura</i>	Recém diluído	Tratam.	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
4,5	3,0	T1	2,2 <sup>Bb</sup>	2,6 <sup>a</sup>	2,6 <sup>Ba</sup>	2,3 <sup>Ba</sup>	1,9 <sup>Ba</sup>	1,9 <sup>Ba</sup>	1,6 <sup>Ca</sup>	1,4 <sup>Ca</sup>
		T2	2,3 <sup>Bab</sup>	2,4 <sup>a</sup>	2,3 <sup>Ba</sup>	2,1 <sup>Ba</sup>	1,8 <sup>Ba</sup>	1,6 <sup>Cab</sup>	1,3 <sup>Ca</sup>	1,2 <sup>Ca</sup>
		T3	2,4 <sup>Bab</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>Ba</sup>	2,1 <sup>Ba</sup>	1,7 <sup>Ba</sup>	1,6 <sup>Cab</sup>	1,4 <sup>Ca</sup>	1,0 <sup>Ca</sup>
		T4	2,4 <sup>Bab</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,3 <sup>Ba</sup>	2,0 <sup>Ba</sup>	1,9 <sup>Ba</sup>	1,7 <sup>Cab</sup>	1,4 <sup>Ca</sup>	1,1 <sup>Ca</sup>
		T5	2,5 <sup>Ba</sup>	2,4 <sup>a</sup>	2,4 <sup>Ba</sup>	2,1 <sup>Ba</sup>	1,8 <sup>Ba</sup>	1,5 <sup>Cb</sup>	1,4 <sup>Ca</sup>	1,1 <sup>Ca</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos, pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ); <sup>A,B,C</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre dias de conservação, pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ); T1 (controle) = 35 °C → 17 °C (7 dias); T2= 35 °C → 30 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T3= 35 °C → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T4= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T5= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/1 hora → 20 °C/4 horas → 17 °C (7 dias).

A motilidade espermática (Tab. 04) apresentou comportamento semelhante ao do vigor, nos diferentes tratamentos, durante todo o período de conservação do sêmen; ou seja, no D0, o T5 (56%) apresentou os melhores resultados, em relação ao T1 (47%) ( $p < 0,05$ ). No D5, o T1 (40%) foi estatisticamente superior ao T5 (29%) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 04:** Percentagem de espermatozoides móveis no sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 7 dias consecutivos.

<i>In natura</i>	Recém diluído	Tratam.	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
94	68	T1	47 <sup>Ba</sup>	57 <sup>Ba</sup>	55 <sup>Ba</sup>	47 <sup>Ba</sup>	40 <sup>Ba</sup>	40 <sup>Ba</sup>	32 <sup>Ca</sup>	28 <sup>Ca</sup>
		T2	51 <sup>Ba</sup>	53 <sup>Ba</sup>	50 <sup>Ba</sup>	42 <sup>Ba</sup>	38 <sup>Ba</sup>	33 <sup>Cab</sup>	26 <sup>Ca</sup>	22 <sup>Ca</sup>
		T3	53 <sup>Bab</sup>	53 <sup>Ba</sup>	48 <sup>Ba</sup>	42 <sup>Ba</sup>	34 <sup>Ba</sup>	32 <sup>Cab</sup>	27 <sup>Ca</sup>	20 <sup>Ca</sup>
		T4	51 <sup>Bab</sup>	53 <sup>Ba</sup>	49 <sup>Ba</sup>	42 <sup>Ba</sup>	37 <sup>Ba</sup>	33 <sup>Cab</sup>	28 <sup>Ca</sup>	21 <sup>Ca</sup>
		T5	56 <sup>Bb</sup>	54 <sup>Ba</sup>	48 <sup>Ba</sup>	42 <sup>Ba</sup>	36 <sup>Ba</sup>	29 <sup>Cb</sup>	28 <sup>Ca</sup>	20 <sup>Ca</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes, diferenças significativas entre tratamentos, pelo teste do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ); <sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas diferentes, diferenças significativas entre dias conservação pelo teste do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ); T1 (controle) = 35 °C → 17 °C (7 dias); T2= 35 °C → 30 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T3= 35 °C → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T4= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T5= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/1 hora → 20 °C/4 horas → 17 °C (7 dias).

O efeito benéfico da incubação antes da conservação final do sêmen suíno tem sido reportado por diversos autores e está relacionado à qualidade do sêmen, tanto descongelado (PURSEL *et al.*, 1972; COURTENS e PAQUIGNON, 1990; BWANGA, 1991; MAXWELL e JOHNSON, 1997; ERIKSSON *et al.*, 2001; MEDRANO *et al.*, 2002), quanto refrigerado (PURSEL *et al.*, 1973b; NASCIMENTO *et al.*, 1998; KOTZIAS-BANDEIRA, 1999; KATZER *et al.*, 2001a,b,c; ZOU e YANG, 2000; KATZER, 2009; SILVA *et al.*, 2014).

O fato de no D0 ter existido uma superioridade do T5 em relação ao T1, tanto para o vigor, quanto para a motilidade, pode ser explicado pelo fato de que os ejaculados, quando são submetidos a períodos de incubação em temperaturas superiores às de conservação, as células espermáticas adquirem uma maior capacidade de rearranjo de suas membranas plasmáticas (BUHR, 1990). Desta forma, nos tratamentos em que o sêmen foi submetido à incubação, os espermatozoides conseguiram se adaptar melhor ao meio ambiente, a despeito do choque térmico provocado pelo abaixamento da temperatura (BUHR, 1990; SILVA *et al.*, 2014). A inversão dos valores, a partir do D1, podem ser atribuídos ao fato de que os espermatozoides dos tratamentos com incubação permaneceram um maior tempo com uma taxa metabólica mais alta; muito embora não tenham sido realizados testes bioquímicos, para se aferir o consumo de diversas

substâncias, tais como o O<sub>2</sub>. Este comportamento ocorreu, devido ao fato dos tratamentos com incubação levarem entre 5 e 9 horas a mais para alcançarem a temperatura de 17 °C e, com isso, diminuïrem o seu metabolismo e conseqüente gasto de energia, aumentando o tempo de conservação, uma vez que, em temperaturas mais altas (39 °C), ocorre uma perda significativa da qualidade espermática, em uma conservação de 48 horas, quando comparado a temperaturas de 20 a 15 °C (ZOU e YANG, 2000).

Analisando-se o efeito da conservação, observou-se que nos resultados apresentados nas Tab. 03 e 04, dentro de cada tratamento, houve inicialmente diferenças estatísticas entre os valores do sêmen puro, do recém diluído e do conservado até D5, para todos os tratamentos. Nas análises do sêmen diluído e conservado (D0 a D5), somente o T1 conseguiu manter valores mais altos (vigor e motilidade) até D5, sendo significativamente melhor apenas do que o T5 ( $p < 0,05$ ). Todos os tratamentos permitiram uma melhor manutenção dos valores do vigor e motilidade espermática, durante o período de conservação. Apenas após D4, os valores caíram significativamente, exceto em T1, que ainda manteve por mais um dia, até D5.

O fato de somente o T1 ter conseguido manter os valores de vigor e motilidade por mais um dia (D5), de uma certa forma, foi esperado; uma vez que o tratamento sem incubação prévia pode conseguir conservar mais energia, a despeito do choque térmico ocasionado (ZOU e YANG, 2000; CÂMARA e GUERRA, 2011). Por outro lado, autores afirmam que a temperatura crítica durante o processamento do sêmen suïno é 12 °C (ALTHOUSE *et al.*, 1998). Dessa forma, talvez protocolos de refrigeração do sêmen suïno que possuam como temperatura final de conservação, talvez não necessitem de resfriamento gradual, para se prolongar a qualidade do sêmen durante o período de conservação.

Para a percentagem de espermatozoides com acrossomas morfologicamente normais (NAR), no dia de coleta (D0), não houve diferenças entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Tab. 05). Logo após a diluição do sêmen, antes do resfriamento, o ejaculado apresentou 98,5% de espermatozoides com NAR. Na avaliação realizada após 1 hora da diluição do sêmen, foi observada a queda dessa qualidade com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos T3 (97,0%), T4 (97,0%) e T5 (94,5%), em relação ao sêmen recém diluído. Somente os tratamentos T1 e T2, mantiveram no D0 valores equivalentes ( $p > 0,05$ ) ao sêmen, logo após a diluição. Quando a comparação foi feita entre os tratamentos, nos três dias de conservação (D0, D5 e D7), notou-se que não houve diferenças entre eles ( $p > 0,05$ ). O T5 que obteve o menor percentual de NAR (94,5%), ainda assim, apresentou uma quantidade de acrossomas normais, que se encontra dentro das normas de utilização

preconizadas pelo CBRA (2013).

Esta falta de diferenças significativas entre tratamentos esteve de acordo com os resultados de outros autores (ALTHOUSE *et al.*, 1998), que também não encontraram alterações. Segundo Maxwell e Jonhson (1997), isso foi devido à adição de albumina sérica bovina ao diluente utilizado, o que pode ter conferido uma maior resistência à célula espermática. Por outro lado, o fato de não terem sido encontradas diferenças morfológicas significativas entre os tratamentos, pode ter sido devido ao fato do sêmen suíno não ter atingido a temperatura crítica de 12 °C (ALTHOUSE *et al.*, 1998) e, conseqüentemente, não ter apresentado um grande número de alterações, para que os efeitos do processo de incubação seminal pudessem aumentar a resistência da célula espermática ao choque térmico. O comportamento do ejaculado, independente do tratamento utilizado, mostrou que no processamento do sêmen suíno, o momento da diluição deve ser considerado um ponto crítico, visando a manutenção da qualidade espermática, uma vez que as discussões sobre o período de incubação levam em consideração, principalmente, o tempo de equilíbrio do sêmen, até atingir a temperatura final de conservação. Estudos envolvendo etapas de resfriamento do sêmen pré-congelamento consideram o BTS ainda melhor opção de diluente, tanto na etapa de resfriamento, quanto na de ressuspensão pós- descongelamento (BARROS *et al.*, 2015).

**Tabela 05:** Percentual de células com acrossomas morfolologicamente normais (NAR) no sêmen diluído e conservado por 7 dias, a 17 °C.

	D0	D4	D7
<b>Diluído</b>	98,5 <sup>a</sup>	-*-	-*-
<b>T1</b>	97,0 <sup>ab</sup>	91,5 <sup>a</sup>	80,0 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	97,5 <sup>ab</sup>	90,0 <sup>a</sup>	81,5 <sup>a</sup>
<b>T3</b>	97,0 <sup>b</sup>	92,0 <sup>a</sup>	83,0 <sup>a</sup>
<b>T4</b>	97,0 <sup>b</sup>	92,0 <sup>a</sup>	83,0 <sup>a</sup>
<b>T5</b>	94,5 <sup>b</sup>	91,0 <sup>a</sup>	83,5 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos, pelo teste do Qui- quadrado ( $p < 0,05$ ); T1 (controle) = 35 °C → 17 °C (7 dias); T2= 35 °C → 30 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T3= 35 °C → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T4= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/4 horas → 17 °C (7 dias); T5= 35 °C → 30 °C/1 hora → 25 °C/1 hora → 20 °C/4 horas → 17 °C (7 dias).

Os dados encontrados neste trabalho para as alterações espermáticas estão de acordo com aqueles indicados por Huo *et al.* (2002), que encontraram, aos 7 dias de conservação, uma percentagem de 79,83% de acrossomas normais, independentemente do tratamento. Por outro lado, Kommissrud *et al.* (2002), ao analisarem a integridade acrossomal de espermatozoides conservados

entre 16 e 18 °C, obtiveram resultados aquém do encontrados neste estudo; provavelmente, devido a influências do próprio varrão. De uma maneira geral, pode-se confirmar os efeitos benéficos da incubação do sêmen sobre a porcentagem de alterações morfológicas (PURSEL *et al.*, 1972; BAMBA e CRAN, 1988), fato esse também confirmado nos resultados deste trabalho.

Os efeitos benéficos sobre o sêmen citados na literatura e ligados ao tipo de curva de resfriamento (POLGE, 1956; KATZER, 2009 *Idem*), permitem a manutenção da viabilidade espermática a 17 °C, conforme resultados encontrados neste trabalho. Quando se efetua um resfriamento gradual, ao invés do direto, ocorre um aumento dos valores de motilidade e de integridade morfológica (ERIKSSON *et al.*, 2001; KATZER, 2009; ALMEIDA, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016).

Segundo Johnson *et al.* (2000), durante o dia de coleta, observou-se um aumento da motilidade e do vigor, devido ao tipo de resposta que os espermatozoides de mamíferos apresentam após diluição, com um aumento inicial da atividade seguido por um aumento dos danos à membrana. O sêmen suíno refrigerado apresenta quedas dos valores de motilidade e aumento das alterações morfológicas, quando é armazenado por um período de 24 horas (ALKMIN *et al.*, 2011); isto foi evidenciado neste trabalho, onde houve quedas significativas, tanto no vigor, quanto na motilidade, entre o momento da diluição e a análise 24 horas após, ou seja, no D1.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as diferentes curvas de resfriamento do sêmen suíno diluído não forneceram condições para uma conservação mais prolongada (além do 5º dia), como também não resultaram em prejuízos para o sêmen conservado. Entretanto, encontrou-se, ainda, um forte efeito da diluição sobre a qualidade seminal, a qual constituiu-se como ponto crítico no processamento do sêmen suíno e que ainda necessita de maiores informações, para se entender realmente o que ocorre com o espermatozoide durante esse procedimento e o que pode ser feito para tentar minimizar os seus efeitos.

## REFERÊNCIAS

- ALKMIN, D.V.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; SIQUEIRA, A.P.; MACHADO, G.S.; SILVA, C.L.A.; TARANTINI, T.C. Efeito da porção do ejaculado e do método de resfriamento sobre as características físicas do sêmen suíno. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.6, p.1287-1294, 2011.
- ALMEIDA, M.C.S. Impacto da diluição isotérmica e bitérmica sobre a qualidade do semen suíno. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. 49p.
- ALTHOUSE, G. C.; WILSON, M. E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v.50, p.535-543, 1998.
- ARAÚJO, L.R.S, BARROS, T.B., GUIMARÃES, D.B., CANTANHÊDE, L.F., DIAS, A.V., TONIOLLI, R. Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.1, p.26-35, 2016.
- BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; SOUZA, L.P.; FEUGANG, J.M.; TONIOLLI, R. Leite em pó desnatado como diluente alternativo na etapa de resfriamento durante protocolo de congelação do sêmen suíno. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.36, n.3, supl.1, p.2023-2030, 2015.
- BAMBA, K.; CRAN, D.G. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *Journal of Reproduction Fertility*, v.82, p.509-518, 1988.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientifiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.17-32, 2005.
- BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. *Proceeding in 2<sup>th</sup> International Conference on Boar Semen Press*, Beltsville-USA, p 81-93, 1990.
- BWANGA, C.O. Cryopreservation of boar sperm. *Acta Veterinariae Scandinavae*, v.32, p.431-453, 1991.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.33-40, 2011.

CASTELO, T.S. Efeito dos processos de centrifugação, diluição e descongelação sobre a qualidade do semen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758). 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2010. 100p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3ª ed., Belo Horizonte, 2013. 104p.

COURTENS, J.L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen, and frozen-thawed spermatozoa of the boar. Proceeding in 2<sup>th</sup> International Conference on Boar Semen Pres., Beltsville-USA, p.61-87, 1990.

ERIKSSON, B.M.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.55, p.1593-1605, 2001.

GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B., CANTANHÊDE, L.F., FEUGANG, J.M.N., SOUZA, L.P., TONIOLLI, R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. *Ciência Animal Brasileira*, v.19, p.1-16, 2018.

HUO, L. MA, X., YANG, Z. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, v.8632, p.1-12, 2002.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.143-172, 2000.

KATZER, L.H. Resfriamento de sêmen suíno: efeito da temperatura de armazenamento, incubação prévia, taxa de resfriamento e diluentes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, n.1, p.97- 98, 2009.

KATZER, L.H.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BERNARDI, M.L.; PEIXOTO, C.H.; VIDOR, R.M. Viabilidade do sêmen suíno armazenado a 12 °C e 5 °C após incubação a 17 °C. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Anais, Anais, v.2, Porto Alegre-RS, p.241-242, 2001a.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; PADILHA, A.P.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; COSTI, G.; DIEHL, G.N. Diferentes temperaturas e diluentes no resfriamento do sêmen suíno. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Anais, v.2, Porto Alegre- RS,

p.243-244, 2001b.

KATZER, L.H.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; POSTAL, A.T.; PADILHA, A.P.; LECZNIESKI, L.F.; BERNARDI, M.L. Armazenamento de sêmen suíno a 5 °C de acordo com o período de incubação e a taxa de resfriamento. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Anais, Anais, v.2, Porto Alegre-RS, p.245-246, 2001c.

KOTZIAS-BANDEIRA, E. Influência de diferentes diluentes e temperaturas de refrigeração sobre a qualidade de sêmen suíno. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.4, p.75-83, 1999.

KOMMISRUUD, E., PAULENZ, H., SEHESTED, E., GREVLE, I.S. Influence of Boar and Semen Parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.43, p.49-55, 2002.

KUMUS S.A. (Ed.) Manual de inseminación artificial porcina. Madrid (Espanha), 1993. 81p.

LALRINTLUANGA, K.; DEKA, B.C.; NATH, K.C.; HMAR, L.; BHUYAN, D.; BISWAS, R.K. Effect of different extenders on the quality of boar semen during preservation at 18°C. *International Journal of Multidisciplinary Approach & Studies*. v.3, n.1, p.224-232. 2016.

LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R.; RUMPF, R.; NEVES, J.P. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.4, 2010.

LÓPEZ RODRIGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN SOON, A.; MAES, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, n.5, p.63-66, 2011.

MAES, D.; LÓPEZ RODRIGUES, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN, S.A. Artificial insemination in pigs. *Artificial insemination in farm animals*, v.1, p.74-79, 2011.

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

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.

MEDRANO, A.; WATSON, A.; HOLT, W.V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*, v.123, n.2,

p.315-322, 2002.

NASCIMENTO, E.F.; VALE FILHO, V.R.; SILVA FILHO, J.M.; NASCIMENTO, J.F.K. Efeito da taca de resfriamento sobre a motilidade, sobrevivência e morfologia espermática de varrões. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.6, p.691-694, 1998.

POLGE, C. Artificial insemination in Pigs. *Veterinary Record*, v.68, n.4, p.62-75, 1956.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Distribution of glutamic oxaloacetic transaminase dehydrogenase activities in boar semen after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.7, p.141-144, 1970.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrossome morfology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, v.34 n.2, p.278-283, 1972.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHUMAN, L.L. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15 °C. *Journal of Animal Science*, v.35, n.2, 157-161, 1973a.

PURSEL, V.G.; SCULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5 °C. *Journal of Animal Science*, v.35, n.3, p.371-277, 1973b.

RIESENBECK, A. Review on international trade with boar semen. *Reproduction in domestic Animals*, v.46, suppl.2, p.1-3, 2011.

SCHULZE, M., HENNING, H., RÜDIGER, K., WALLNER, U., WABERSKI, D. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology*, v.80, n.9, p.990-998, 2013.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; JUNG, M.; GROSSFELD, R. Use of refractometry as a new management tool in AI boar center for quality assurance of extender preparations. *Animal Reproduction Science*, v.152, p.77-82, 2015.

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.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoides de verrat: amelioration des conditions de conservation. 1996, 91p. These (Doctorat) - Universite Francois Rabelais de Tours - France, 1996. Resumo disponível em <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=182303>>.

ZOU, C.X.; YANG, Z.M. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*, v.53, p.1477-1488, 2000.