

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO INTRAMUSCULAR DE
VITAMINAS E MINERAIS SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CACHAÇOS.**

Verónica González Cadavid

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO INTRAMUSCULAR DE
VITAMINAS E MINERAIS SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CACHAÇOS.**

Verónica González Cadavid

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Cristina Thomaz

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro 2010

González Cadavid, Verónica
G643e Efeito da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a criopreservação do sêmen de cachacos / Verónica González Cadavid. -- Jaboticabal, 2010

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

Orientador: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Banca examinadora: Rubens Paes de Arruda, Juliana Corrêa Borges Silva.

Bibliografia

1. Suplementação intramuscular de Vitaminas e minerais. 2. Criopreservação. 3. Sêmen de cachacos. I. Título. II. Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp.

CDU636.4:636.082.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: vgonzalc@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VERÓNICA GONZÁLEZ CADAVID – nascida em 03 de Dezembro de 1977, em Medellín, Colômbia, é Zootecnista formada pela *Universidad Nacional de Colômbia* – Câmpus de Medellín, em abril de 2005. Realizou estagio curricular na reprodução de ovinos de corte raça Santa Inês na Universidade de Brasília, além de realizar estágio voluntário – Manejo de Animais de Zoológico - na Fundação Pólo Ecológico de Brasília - 2004. Participou de extensão universitária como auxiliar docente da Reprodução Animal e Melhoramento Genético na Universidade Nacional de Colômbia – Campus de Medellín, do 2002 ao 2003. Teve vinculo institucional na empresa avícola Avifonce S.A na Colômbia desempenhando a função de técnico na Avicultura como gerente da região de Antioquia, no período do 2005 ao 2007.

É proibido chorar sem aprender,
Levantar-se um dia sem saber o que fazer
Ter medo de suas lembranças.

É proibido não rir dos problemas
Não lutar pelo que se quer,
Abandonar tudo por medo,
Não transformar sonhos em realidade.

É proibido não demonstrar amor
Fazer com que alguém pague por tuas dúvidas e mau-humor.

É proibido não ser você mesmo diante das pessoas,
Fingir que elas não te importam,
Ser gentil só para que se lembrem de você,
Esquecer aqueles que gostam de você.

É proibido não fazer as coisas por si mesmo,
Não crer em Deus e fazer seu destino,
Ter medo da vida e de seus compromissos,
Não viver cada dia como se fosse um último suspiro.

É proibido sentir saudades de alguém sem se alegrar,
Esquecer seus olhos, seu sorriso, só porque seus caminhos se desconstruíram,
Esquecer seu passado e pagá-lo com seu presente.

É proibido não tentar compreender as pessoas,
Pensar que as vidas deles valem mais que a sua,
Não saber que cada um tem seu caminho e sua sorte.

É proibido não criar sua história,
Deixar de dar graças a Deus por sua vida,
Não ter um momento para quem necessita de você,
Não compreender que o que a vida te dá, também te tira.

É proibido não buscar a felicidade,
Não viver sua vida com uma atitude positiva,
Não pensar que podemos ser melhores,
Não sentir que sem você este mundo não seria igual.

Pablo Neruda

DEDICATORIA

Dedico a realização deste trabalho aos meus pais, **Gabriel Francisco González** e **Maria Lindelia Cadavid** que, com tanto esforço e amor, me proporcionaram a força e energia para prosseguir nesta longa jornada, afastada do meu lar e, por me ensinarem desde a infância a lutar por um ideal e a acreditar na possibilidade de conquistá-lo, vocês são meu motor e com vocês aprendi fazer as coisas com muito amor. Dou infinitas graças a Deus por me ter abençoado com a sua presença.

À meus irmãos:

Andrea e **Juan Pablo** pelo amor que percorre por nossas veias, amor que se transforma em companheirismo, compreensão e união que nos caracteriza.

À minha sobrinha e cunhada:

Salome e **Cristina**, pelo apoio e carinho sempre incondicional, pelo inocente sorriso da minha sobrinha que me dá energia para continuar.

À minha família:

Tios, tias, primos e primas, que com seu amor infinito, compreensão e apoio, ajudaram a formar a mulher que sou agora, adoro vocês.

OFERECIMENTO

À Profa. Dra. **Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima**, pela orientação, confiança, estímulo, pela dedicação na realização desta dissertação e principalmente pela sua amizade.

À minha amiga **Fernanda Celestino Morato**, quem sempre esteve do meu lado ajudando-me não só com a elaboração desta dissertação, porque além me brindou a sua sincera amizade, obrigada por estar do meu lado.

Aos professores **Ana Claudia Ruggieri, Antonio Ferraudó, Ricardo Reis e Otto Mack Junqueira**, quem sempre tiveram disposição para me ajudar, obrigada pelos ensinamentos, correções e incentivos.

Aos professores **Guillermo Henao, Monica Reinartz e Luis Emilio Trujillo**, amigos e mestres que muito me influenciaram na definição da minha área de atuação profissional e que me iniciaram e orientaram na carreira acadêmica na *Universidad Nacional de Colômbia*, durante a minha graduação em Zootecnia.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga **Fernanda Celestino Morato**, por ter caminhado do meu lado não só na hora da realização do experimento, obrigada pela amizade e valiosa ajuda nesta etapa da minha vida.

Aos donos e funcionários do **sítio Estiva**, por ter permitido a realização do meu trabalho, e especialmente pelo belo recebimento.

À empresa **Formil Vet Ltda.**, pelos recursos fornecidos fundamentais na realização deste trabalho.

À **Adriana Santana do Carmo**, que sempre com muita disposição soube ajudar-me, obrigada pelas orientações e contribuições.

As **bruxinhas**: Fernanda, Adriana, Carol, Aline, Ana Paula, Letícia e Jaqueline, obrigada pela amizade e pelos divertidos momentos vividos com vocês.

Aos colegas e funcionários do departamento de Reprodução Animal, pela companhia e apoio nos momentos de trabalho no laboratório.

À minha prima **Gloria Cadavid**, foi por você que agora me encontro realizando uns dos meus mais importantes sonhos da minha vida, foi você quem me trouxe ao Brasil, juntas vivemos os melhores momentos, transformando-se em uma paixão por este país.

À meus amigos Brasileiros, pelos momentos de alegria que juntos compartilhamos: Fernanda Basso, Bruno, Otilia, Marina, Juliana Borges, Marcio, Marcelo Morato, Marcelo Bezerra, Rafaela, Greicy, Rosângela, Roberto, Raulito.

À meus amigos Colombianos, obrigada por facilitar minha vida longe de nossa linda Colombia: Henry, Juana, Pedro, Ivan, Julian, Javier, Andres, Dunia, Geovanny, Luis, Dianita, Carol, Edna, Diana, Camilo Guerrero.

| SUMÁRIO | Pág. |
|---|-------------|
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMO..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 19 |
| 2.1. Cenário da inseminação artificial na suinocultura no Brasil e no mundo..... | 19 |
| 2.2. O espermatozóide..... | 20 |
| 2.3. Congelação de sêmen..... | 23 |
| 2.3.1. Danos sofridos pelos espermatozoides durante a criopreservação..... | 24 |
| 2.3.1.1. Choque Térmico..... | 26 |
| 2.3.1.2. Criocapacitação..... | 27 |
| 2.3.1.3. Adição e remoção de crioprotetores..... | 29 |
| 2.4. Requerimentos minerais em suínos sexualmente ativos..... | 30 |
| 2.4.1. Minerais e vitaminas para cachaços..... | 33 |
| 2.4.1.1. Minerais e minerais quelatados..... | 33 |
| 2.4.1.2. Selênio (Se) e vitamina E..... | 33 |
| 2.4.1.3. Cálcio (Ca ⁺) e fósforo (P) e vitamina D..... | 37 |
| 2.4.1.4. Zinco (Zn)..... | 38 |
| 2.4.1.5. Cobre (Cu)..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1.6. Magnésio (Mg)..... | 40 |
| 2.4.1.7. Cobalto (Co)..... | 40 |
| 2.4.1.8. Vitaminas e sêmen..... | 40 |
| 3. OBJETIVOS..... | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 4.1. Análises estatísticas..... | 43 |
| 4.1.1. Fase Exploratória..... | 43 |
| 4.2. Delineamento experimental..... | 45 |
| 4.3. Protocolo de congelação do sêmen..... | 49 |
| 4.4. Avaliação da qualidade espermática..... | 50 |
| 5. RESULTADOS..... | 52 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 60 |
| 6.1. Sêmen <i>in natura</i> vs sêmen congelado..... | 61 |
| 6.2. Sêmen <i>in natura</i> antes e depois da suplementação..... | 62 |
| 6.3. Sêmen descongelado antes e após a suplementação..... | 63 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 65 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dietas e Requerimentos diários de aminoácidos, minerais, vitaminas, e ácidos graxos de cachaaos sexualmente ativos (90% de matéria seca).

Tabela 2. Composição da dieta dos cachaaos.

Tabela 3. Correlação entre as características seminais e os componentes principais CP1 e CP2.

Tabela 4. Médias e F da análise de variância das características estudadas.

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 1. Desenho do delineamento experimental.

Figura 2. Perfil de médias das características seminais para os dois grupos formados pelo método k-médias.

Figura 3. Centróide contendo as médias das características seminais para os quatro grupos formados pelo método k-médias.

Figura 4. Biblot contendo a distribuição dos grupos seminais de acordo com os componentes principais CP1 e CP2 e as direções das características envolvidas.

LISTA DE ABREVIATURAS

MOTIL: Motilidade

AT: Coloração vital Azul de Tripán/Giemsa

AT-VI: Espermatozóides vivos Íntegros

AT-VSA: Espermatozóides vivos sem acrossomo

AT-M: Espermatozóides mortos

HO

HO-TUR: Espermatozóides com cauda túrgida

HO-ENRO: Espermatozóides com cauda enrolados

MORF: Morfologia

MORF: Morfologia

ROS: Espécies reativas de oxigênio

UI: Unidades internacionais

mL: Mililitros

g: gramas

SSF: Solução de Formol salino

μL: Micro litros

mO₂/kg:

ppm: Partes por milhão

JC1:

CASA:

μmol: Micro moles

RESUMO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO INTRAMUSCULAR DE VITAMINAS E MINERAIS SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CACHAÇOS

O experimento foi realizado em uma suinocultura de produção comercial da linhagem Topigs, utilizando dez machos reprodutores, com o objetivo de avaliar o efeito das suplementações intramusculares com vitaminas e minerais (Selen-Fos[®] e Zimag[®]) na qualidade espermática do sêmen *in natura* e após a congelação. Foram realizadas duas análises estatísticas: Multivariada para descrição das alterações observadas; ANOVA utilizando o modelo inteiramente casualizado. As variáveis seminais analisadas foram: volume, concentração, turbilhonamento, motilidade, vigor, porcentagem de espermatozóides vivos, mortos, e vivos sem acrossomo, morfologia e integridade da membrana (Teste hiposmótico). O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira fase o sêmen *in natura* dos 10 cachaços foi avaliado e posteriormente congelado. Uma vez terminada esta fase iniciou-se a segunda fase onde sete animais receberam as suplementações com vitaminas e minerais via intravenosa e três permaneceram sem recebê-las. Após um período de 60 dias contados a partir do dia da administração das vitaminas e dos minerais se iniciaram novamente as coletas de sêmen e as avaliações tanto *in natura* como o descongelado. O sêmen *in natura* apresentou melhor qualidade espermática quando comparado com o sêmen descongelado e o sêmen dos cachaços que receberam as suplementações tiveram melhora ($p < 0,05$) significativa na qualidade do sêmen e na criotolerância.

Palavras - chaves: espermatozóides, criotolerância, minerais, suínos, vitaminas.

ABSTRACT

EFFECT OF INTRAMUSCULAR VITAMINS AND MINERALS SUPPLEMENT ON CRYOPRESERVATION OF BOAR SEMEN.

The experiment was conducted in a commercial swine production using ten boars of Topigs[®] line. The aim was to evaluate the effect of intramuscular supplementation of vitamins and minerals (Selen-Fos[®] and Zimag[®]) on fresh semen quality and after freezing. Two statistical analysis were used: multivariate description of the observed changes and ANOVA with randomized design. Analyzed seminal variables were: concentration, turbilhamento, motility, vigor, percentage of live sperm, dead and alive without acrosome, morphology and membrane integrity (HO). The experiment was divided into two phases. In the first phase, the fresh semen of 10 boars was evaluated and subsequently frozen. About three days after the freezing process, the semen was thawed and the quality was assessed. After this in the second phase, seven boars received intramuscular supplementation of minerals and vitamins and three boars received without the supplementation for control. About 60 days later, all these boars were submitted to semen collection and the semen was again evaluated both, fresh and thawed. The fresh semen showed better quality than the frozen-thawed in the two phases of the experiment ($p < 0,05$). The semen of boars that received the supplementation had a significant improvement on semen quality and freezing resistant ($p < 0,05$).

Key words: Spermatozoa, Cryopreservation, minerals, boars, vitamins.

1. INTRODUÇÃO

Uma forma de estimar a produtividade e a conseqüente lucratividade de um sistema de produção de suínos é análise do número de leitões desmamados por fêmea por ano, parâmetro dependente, entre outros fatores, do número de nascidos vivos. Neste ponto, o cachaço contribui, principalmente, como doador de sêmen, seja por monta natural ou inseminação artificial.

A utilização de programas de inseminação artificial (IA) tem aumentado substancialmente, se tornando uma técnica importante para o melhoramento genético de animais. O sêmen a ser utilizado para IA deve apresentar características qualitativas e quantitativas que possibilitem a produção de uma dose inseminante de qualidade.

A técnica de IA na suinocultura não só depende da obtenção do sêmen, mas também, da busca de soluções que permitam a utilização do sêmen resfriado e congelado sem alterações na fertilidade e produtividade do rebanho e para isso, a boa qualidade do sêmen no momento da colheita é de extrema importância.

Durante o processamento do sêmen de suínos, os espermatozóides podem sofrer grandes danos nas membranas espermáticas e nas organelas, gerando baixa capacidade de fertilização e conseqüente diminuição da taxa de prenhez e tamanho da leitegada. Devido a isso, a utilização do sêmen congelado de suíno em larga escala fica impossibilitada. Os principais danos induzidos pelo processamento são as mudanças estruturais e funcionais nos espermatozóides durante a congelação e descongelação.

No processo de criopreservação do sêmen, os espermatozóides são submetidos a um forte choque térmico. A queda brusca de temperatura leva a formação de cristais de gelo e aumento da pressão osmótica, podendo causar danos na membrana plasmática. Além disso, a congelação gera estresse oxidativo, que pode estar associado a efeitos danosos no DNA celular. A administração de vitaminas e minerais via dieta ou mesmo durante a manipulação do sêmen pode reduzir a extensão destes danos. No entanto, os resultados apresentados até então são controversos e se limitam a avaliação de alguns minerais e vitaminas. Informações sobre as necessidades de vitaminas e minerais para cachaços ainda são bastante escassas. Não existem

trabalhos avaliando os efeitos da suplementação completa de cachacos com minerais e vitaminas na qualidade do sêmen após congelação.

Considerando o exposto, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da administração intramuscular de suplemento vitamínico e mineral em cachacos sobre as características seminais de motilidade, vigor, porcentagem de espermatozoides vivos e mortos, condição acrossomal, na reação ao teste hiposmótico e na morfologia do sêmen *in natura* e após congelação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cenário da inseminação artificial na suinocultura no Brasil e no mundo

A carne suína é a mais produzida no mundo, sendo que a China ocupa a primeira posição (49 mil toneladas, com crescimento de 4% ao ano), seguida pela União Européia, com 21 mil toneladas, EUA, com 9,5 mil toneladas, e Brasil, com produção de 2,7 mil toneladas (ROPPA, 2006).

O rebanho suíno brasileiro possui 33 milhões de animais e 2,5 milhões de matrizes, concentrados na região Sul, com 43% do plantel nacional. No que diz respeito à exportação, o Brasil chegou à média de 625 mil toneladas de carne, sendo a Rússia responsável pela compra de 64,75% do total exportado, precedida por Hong-Kong com 9,74%, Ucrânia com 3,54% e Cingapura, com 2,89%, entre outros. Há perspectivas de aumento das exportações para mercados como Japão, Coréia do Sul, México, EUA e União Européia (ROPPA, 2006).

O consumo per capita mundial de carne suína encontra-se por volta de 14,96 kg, seguida da carne de frango, com consumo de 11,5 kg, e a carne de bovinos, 9,7 kg. A China é o maior consumidor, respondendo por 34 kg/habitante/ano (ROPPA, 2006).

Nos últimos 50 anos, pesquisas em seleção genética, biotecnologias e programas de nutrição tiveram um grande impacto no melhoramento da composição das carcaças e na eficiência de produção. O uso da inseminação artificial respondeu por grandes progressos na suinocultura (GERRITS et al., 2005; ERIKSON, 2000) vêm sendo desenvolvidas avanços nas áreas de genética, nutrição e controle de doenças e parasitas.

Devido à aplicação dessas novas tecnologias, nos últimos 10 anos, a produção de carne suína mundial aumentou de 73 para 94 mil de toneladas segundo dados da FAO (2002).

No Brasil, estima-se que 15% das matrizes suínas em idade de reprodução sejam inseminadas artificialmente. Este número esta aquém dos

80% de matrizes inseminadas em países europeus (OBERLENDER *et al.*, 2008)

Um dos entraves ao aumento da utilização da inseminação artificial está na dificuldade de preservação do sêmen suíno por longos períodos. Com o uso de sêmen resfriado entre 15 a 18° C de temperatura, os espermatozóides conservam sua capacidade de fecundação por períodos que vão de 3 a 4 dias, o que inviabiliza seu transporte por longas distâncias. O sêmen suíno congelado tem grande importância no mercado de material genético (ERIKSON, 2000), para transferência deste material entre granjas localizadas em diferentes países com o propósito de atualização genética e melhorias da troca de informações dos bancos de dados, usando sêmen de um mesmo macho em diversos rebanhos (ANTUNES, 2007).

A utilização do sêmen congelado no mundo está em menos de 1% (WAGNER & THIBIER, 2000; ANTUNES 2007) devido a limitações como: baixa fertilidade quando comparada com o uso do sêmen resfriado, com taxa de partos 20 a 30 % menores; diminuição do tamanho de leitegada, sendo de 2 a 3 leitões a menos por leitegada; a dose inseminante maior, da ordem de 6×10^9 espermatozóides enquanto o sêmen resfriado requer de 3 a 4×10^9 espermatozóides; o período de maior fertilidade para a inseminação com sêmen congelado é menor devido a sua sobre vida; existe muita variação entre machos em relação a tolerância a criopreservação (ERIKSON, 2000). No Brasil, o sêmen refrigerado produz médias anuais de parto de 88% e nascidos totais acima de dez. Com sêmen congelado, as taxas de parto normalmente não alcançam 85% e os leitões nascidos não ultrapassam de dez por leitegada (ANTUNES, 2007).

2.2. Estrutura do espermatozóide e sua composição

O espermatozóide é o produto final do processo de espermatogênese, onde ocorrem sucessivas mitoses, meioses e fases pós-meióticas nos túbulos seminíferos do testículo. Durante a fase mitótica, uma progênie de células germinativas sofre uma série de divisões mitóticas para expandir a população de espermatogônias. A fase meiótica é dividida em duas ocorrendo sem duplicação de DNA com o objetivo de produzir células haplóides. Estas duas fases são essenciais para produzir os espermatozóides na fase pós-meiótica

final. Esta fase final, também conhecida como espermiogênese, se caracteriza pela formação do acrossomo, condensação nuclear, perda da maior parte do citoplasma, desenvolvimento do flagelo e rearranjo das mitocôndrias. Como resultado tem-se uma célula altamente diferenciada e especializada em estrutura e função, capaz de se combinar com o óvulo para dar origem às próximas gerações (SENGER, 2002; NEILL, 2006; BOERKE et al., 2007; GALERAUD-DENIS et al., 2007).

Os dois componentes principais do espermatozóide são a cabeça e a cauda. A cauda contém a peça intermediária. A cabeça contém o núcleo, a estrutura do citoesqueleto e uma pequena porção de citoplasma. Anteriormente à cabeça existe uma membrana com uma vesícula citoplasmática que contém enzimas hidrolíticas, denominada acrossomo (NEILL, 2006). A peça intermediária contém mitocôndrias responsáveis pela geração de energia para o movimento flagelar típico do espermatozóide.

A membrana plasmática dos espermatozóides é constituída de uma dupla camada de lipídios, principalmente fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e colesterol. O colesterol tem um importante papel na regulação da fluidez da membrana ao impedir que os ácidos graxos adquiram uma consistência rígida quando em baixas temperaturas, aumenta a flexibilidade e estabilidade da bicamada lipídica (PETTITT et al., 1998). A membrana espermática também está composta de cadeias laterais de ácidos graxos e proteínas. A proporção entre ácidos graxos insaturados e saturados nos fosfolipídios da membrana dos espermatozóides é um dos fatores determinantes da sua resistência ao resfriamento (WHITE, 1993). O alto conteúdo de ácidos graxos faz com que os espermatozóides sejam sensíveis à peroxidação lipídica na presença de O_2 . Na maioria das espécies de mamíferos, mais de 60% do total de ácidos graxos são ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (N-3) (POULOS et al., 1973). Esta composição confere à membrana maior fluidez devido à presença de duplas ligações (ERIKSON, 1998) e pode ser essencial na prevenção de danos pela formação de cristais de gelo. A composição de ácidos graxos da membrana de espermatozóides suínos contém apenas 25% de ácido docosapentaenoico (N-6) e 30% de ácido docosahexaenoico (N-3) (PENNY et al., 2000; ROOKE et al., 2001). Esta característica específica pode contribuir para a menor resistência destes espermatozóides ao processo de congelamento.

Em relação à fertilidade dos espermatozóides, existem duas características principais que devem ser levadas em conta: primeiro, a competência destes espermatozóides em alcançar o local de fecundação do oócito e penetrar a zona pelúcida, uma vez que existem várias barreiras dentro do trato reprodutivo da fêmea para prevenir que espermatozóides com alguma anormalidade completem sua jornada até o oócito. Segundo, a habilidade do espermatozóide de iniciar e sustentar o desenvolvimento do zigoto, embrião ou feto. Uma vez que o espermatozóide penetra o oolema, ele deve emitir um sinal suficiente para ativar o oócito (OSTERMEIER et al., 2005).

Os espermatozóides ejaculados devem sofrer a capacitação e reação acrossomal para se tornarem capazes de fertilizar o oócito. A capacitação espermática é um processo preparatório, em que ocorre a ativação do espermatozóide dentro do oviduto. Durante a capacitação o espermatozóide apresenta movimentação lateral da cabeça, aumento do movimento flagelar e tem uma trajetória não linear. As modificações funcionais devido à capacitação incluem a habilidade do espermatozóide de sofrerem a reação acrossomal (SALLING et al., 1979; FLORMAN et al., 1999). Durante a capacitação ocorre reorganização da membrana plasmática que recobre a cabeça do espermatozóide devido à redistribuição dos fosfolípidios e remoção do colesterol (LANGAIS & ROBERTS, 1985; LIN & KAN, 1996).

A reação acrossomal se inicia quando a membrana plasmática que recobre toda a cabeça do espermatozóide começa a formar diversos pontos de fusão com a membrana acrossomal externa. Quando as duas membranas se fundem nestes pontos, várias vesículas pequenas são formadas. Este processo é chamado de vesiculação. Após este processo, as enzimas componentes do acrossomo são liberadas, expondo a membrana acrossomal interna. Alterações de pressão osmótica, resfriamento ou aquecimento súbitos ou mudanças bruscas de pH podem gerar danos irreversíveis nas membranas plasmática e acossomal, causando perda prematura dos componentes do acrossomo fazendo com que este espermatozóide perca sua capacidade de fertilização (SENGER, 2002).

A remoção do colesterol da membrana parece ser o primeiro sinal ativador do processo de capacitação e reação acrossomal (SHADAN et al., 2004). A saída do colesterol aumenta a fluidez da membrana e favorece a

entrada de íons de cálcio e bicarbonato (TRAVIS & KOPF, 2001). Estes íons ativam diretamente a adenil ciclase solúvel do espermatozóide a catalisar a formação de cAMP (BAILEY et al., 2008). A concentração intracelular de cAMP está diretamente envolvida com a reação acrossomal devida a ação na inibição da adenosina (MIAH et al., 2006). Desta forma, a elevação das concentrações intracelulares de cálcio está entre os processos iniciadores da reação acrossomal (FLORMAN et al., 1999). A regulação da reação acrossomal pode estar envolvida na abertura dos canais de cálcio que são dependentes da voltagem, do influxo de cálcio e da manutenção de altas concentrações de cálcio intracelulares (EVANS & FLORMAN, 2002).

2.3. Congelação de sêmen

A possibilidade de congelação do sêmen suíno sem grandes prejuízos aos índices de produtividade das granjas possibilitaria uma série de vantagens: facilitar cruzamentos e acasalamentos, por possibilitar o transporte de material genético; possibilitar o planejamento de acasalamentos para obter o máximo progresso genético a cada geração, devido à longa vida de um banco de sêmen congelado (ERIKSON, 2000); preservar o material genético de raças de suínos em extinção, inclusive no Brasil (EGITO et al., 2002); controlar a transmissão de doenças, aumentando a biossegurança do rebanho (BAILEY et al., 2008).

O sêmen criopreservado de mamíferos em geral, apresenta diminuição da fertilidade quando comparado ao sêmen *in natura* (WATSON, 2000). As razões para este decréscimo são várias: susceptibilidade ao choque térmico; estresse osmótico; a formação de cristais de gelo durante os processos de congelação e descongelação e danos oxidativos (MAZUR, 1984). O sêmen de suíno, em especial quando congelado, apresenta algumas modificações parecidas com o processo de capacitação, o que parece ser responsável pela grande redução da fertilidade observada (GREEN & WATSON, 2001). No processo de criopreservação de espermatozoides suínos, apenas 50% das células consegue sobreviver (JOHNSON, 1985)

Nas últimas décadas, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para a solução deste problema. A elevação dos resultados de fertilidade como o uso do sêmen congelado depende da geração de novos conhecimentos em um vasto campo

da ciência, que incluem desde áreas com a bioquímica e a criobiologia, até aspectos aplicados às metodologias de congelamento e a determinação do momento ideal de inseminação (MURGAS, 1999)

2.3.1. Danos sofridos pelos espermatozóides durante a criopreservação

2.3.1.1. Danos Oxidativos.

Células vivas, estocadas em condições aeróbicas, requerem oxigênio para sustentar sua atividade metabólica. No entanto, o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode causar danos oxidativos celulares (THUWANUT et al., 2008). ROS são radicais com moléculas de oxigênios com um ou mais elétrons não pareados (BURTON & INGOLD, 1986), que tendem a se ligar a outras moléculas, alterando-as (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007). Os radicais danosos são: o ânion superóxido (O_2^-), peróxidos (H_2O_2) e os radicais hidroxila livres (OH \cdot). Os peróxidos são os que apresentam maior potencial de danos (VISHWANATH & SHANNON, 1997; BILODEUA et al., 2002).

As células espermáticas são sensíveis aos ROS devido a sua estrutura particular. A membrana plasmática dos espermatozóides está envolvida com a fixação na zona pelúcida do óvulo, bem com as mudanças importantes que ocorrem durante o processo de capacitação espermática. As mitocôndrias localizadas na peça intermediária do espermatozóide geram a energia necessária para a movimentação do mesmo. Estas mitocôndrias são as principais fontes geradoras de ROS (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007). Os danos pelas ROS na membrana espermática ou DNA são causados pelo acúmulo excessivo de peróxido (H_2O_2), o produto final do radical superóxido, em espermatozóides humanos (LOPES et al., 1998; AITKEN & KRAUS, 2001) e bovinos (CHATTERJEE & GAGNON, 2001).

Os danos oxidativos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio, principalmente no DNA mitocondrial e arquitetura da membrana podem ser os fatores de maior relevância para diminuição da motilidade e fertilidade dos espermatozóides, em especial no sêmen criopreservado (CUMMINS et al., 1994). Foi demonstrado que a perda de motilidade em amostras de sêmen e espermatozóides individuais nas mesmas amostras estava relacionada com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio no espermatozóide (ERASMUS et al., 1992). A presença de excesso de ROS no sêmen tem sido associada com

baixas concentrações e motilidade e a piora na morfologia (AGARWAL et al., 1994).

O sêmen de suínos parece ser particularmente sensível aos danos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio devido ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e fosfolipídeos de membrana (STUBBS & SNITH, 1984). A peroxidação dos lipídeos dos ácidos graxos pode ser um dos mecanismos responsáveis para as mudanças bioquímicas e fisiológicas negativas durante a estocagem deste sêmen (CEROLINI, et al., 2000) associadas a baixa capacidade antioxidante do plasma seminal suíno (BREZEZINSKA-SLEVBODZINKA et al., 1995).

O processo de criopreservação aumenta a peroxidação de lipídios em muitas espécies animais (SLAWETA et al., 1988, JEONG et al., 2009).

Os organismos desenvolvem diversos mecanismos de defesa para se proteger dos danos causados por estas espécies de oxigênio reativas. Pequenas moléculas como a vitamina E (α -tocoferol) são capazes de reagir com estes radicais diretamente (BURTON & INGOLD, 1986). A vitamina E atua na reação de peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (DIEBER-ROTHENEDER et al., 1991). No plasma seminal, os mecanismos para neutralizar os efeitos da oxidação incluem a vitamina E e certas enzimas, dentre elas, a glutathiona peroxidase, que é dependente de selênio e a peróxido dismutase, dependente de cobre e zinco (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007).

Alguns estudos indicaram que a criopreservação diminui a capacidade de defesa das células frente às espécies reativas de oxigênio. Diminuição da atividade da enzima peróxido dismutase já foi observada em sêmen criopreservado de bovinos e humanos, quando comparado ao sêmen fresco (LASSO et al., 1994; BILODEAU et al., 2000). Além disso, a criopreservação reduziu as concentrações da glutathiona peroxidase em 78% no sêmen de bovinos (BILODEAU et al., 2000).

A enzima glutathiona peroxidase também é importante antioxidante. GADELA, et al. (2004) a glutathiona é um tripeptídeo distribuído nas células vivas ela desempenha papel importante no mecanismo de defesa intracelular contra estresse oxidativo (IRVINI, 1996). A glutathiona peroxidase usa a glutathiona para reduzir os radicais livres de peróxido de hidrogênio a água e os lipoperoxidos a álcool alcalino. GADELA, et al. (2004) determinaram o

conteúdo de glutatina no espermatozóide suíno antes e depois da criopreservação. Após a criopreservação os autores encontraram uma redução de 32% no conteúdo de glutatona. No mesmo trabalho os autores concluíram que adição de glutatone no diluente resultou num aumento da tolerância da crioconservação do sêmen.

2.3.1.1. Choque Térmico

A velocidade de diminuição da temperatura durante o processo de congelação de sêmen pode induzir um estresse letal às células espermáticas, variando com a taxa de resfriamento e a amplitude de temperatura (WATSON, 1981). Este fenômeno é conhecido como choque térmico. Nos espermatozóides suínos, este fenômeno é manifestado imediatamente após a coleta do sêmen, porém, as células se tornam cada vez menos sensíveis a este processo com o passar do tempo após a colheita (PURSEL et al., 1972). TAMULI & WATSON (1994) investigaram este fenômeno e concluíram que o sêmen de suínos incubado em temperatura ambiente no plasma seminal se torna mais resistente ao choque térmico após 16 horas da coleta. Os autores sugeriram que o tempo de criopreservação do sêmen de suínos deveria ser depois de 18-24 horas após a coleta e não dentro do período de 6 horas como comumente é realizado.

MAZUR et al. (1972) propuseram a teoria de que os danos celulares e a morte de células espermáticas decorriam da exposição prolongada destas células a altas concentrações de solutos, o que ocorre quando a queda de temperatura durante a congelação é lenta e da formação de cristais de gelo intracelulares, o que ocorre quando a congelação é muito rápida. No entanto, o estresse celular produzido pela formação de cristais de gelo é acompanhado pela mudança de pressão osmótica na fração celular não congelada (WATSON & DUNCAN, 1988), pois os solutos restantes são dissolvidos na fração que permanece líquida, aumentando a concentração osmótica da solução. A proporção da água que cristaliza e a concentração osmótica da solução remanescente dependem da temperatura. Quanto menor a temperatura, menor a quantidade de fração não congelada e, conseqüentemente, maior a concentração osmótica da solução. O tempo de duração da exposição da célula a estes eventos deve ser minimizado para aumentar sua sobrevivência,

o que implica dizer que a velocidade de diminuição da temperatura deve ser alta. No entanto, esta velocidade deve ser lenta o bastante para possibilitar que a água no interior de célula saia por osmose, prevenindo a formação de cristais no interior da célula que é letal (WATSON, 2000).

É um fato conhecido de que há aumento na permeabilidade da membrana dos espermatozóides após o resfriamento (ROBERTSON & WATSON, 1986; ROBERTSON et al., 1988) e exposição a altas concentrações de sais com posterior retorno do equilíbrio osmótico, característico do ciclo de congelação (BAILEY et al., 2000). Estes processos podem ser devido a efeitos nos canais de proteínas. O aumento da permeabilidade da membrana induz tremendas alterações no volume celular tanto na fase de diminuição da temperatura quando no processo de descongelação, o que leva a um considerável estresse mecânico na membrana celular (NOILES et al., 1995).

Durante o processo de queda da temperatura, existe uma mudança na estrutura da membrana dos espermatozóides. Especificamente em suínos, ocorre agregação das proteínas que antes estavam distribuídas de forma aleatória e estas alterações não são completamente revertidas durante a descongelação (BUHR et al., 1989). Estas mudanças estruturais desestabilizam a membrana, pré-disponibilizando o espermatozóide a defeitos morfológicos, como a ausência ou anormalidades cromossômicas (BAILEY et al., 2000). Além disso, esta reorganização estrutural da membrana plasmática da cabeça do espermatozóide pode danificar os receptores espermáticos, afetando sua capacidade de interagir normalmente com as células do trato reprodutivo feminino, diminuindo seu poder de fecundação (GOLDMAN et al., 1998).

2.3.1.2. Criocapacitação

A regulação dos canais de cálcio também é claramente afetada pela congelação e este fato, indubitavelmente, leva a sérias conseqüências ao funcionamento da célula (BAILEY & BUHR, 1994). Em casos severos, os danos se tornam incompatíveis com a sobrevivência celular. As mudanças na regulação do cálcio durante o resfriamento podem contribuir para a criocapacitação, que são mudanças parecidas com capacitação que os espermatozóides sofrem durante a congelação (WATSON, 2000).

A criocapacitação que os espermatozóides sofrem, em especial na espécie suína, tem uma grande responsabilidade na perda de capacidade de fertilização dos que sobrevivem ao processo de criopreservação (BAILEY et al., 2003). O mecanismo de como ocorre o processo de criocapacitação não está bem elucidado, uma vez que nem a capacitação espermática normal não é totalmente conhecida. Espermatozóides capacitados ou criocapacitados exibem várias características em comum, como padrões de reorganização da membrana, elevados níveis de cálcio intracelular; geração de espécies reativas de oxigênio; capacidade de fecundação *in vitro*. WATSON (2000) estudou este fenômeno e observou que espermatozóides resfriados apresentam aumento da concentração do Ca^{2+} livre, o que é tipicamente observado em espermatozóides capacitados, porém, os padrões de fosforilação da tirosina são diferentes em espermatozóides resfriados e aquecidos em reação aos capacitados.

A criocapacitação gera espermatozóides com vida útil mais curta, reduzindo efetivamente sua capacidade de fecundação (BAILEY et al., 2000). Pesquisa com a inseminação artificial utilizando sêmen congelado em suínos reduzindo o tempo entre a ovulação e a inseminação artificial, tem apresentado resultados próximos aos obtidos com sêmen resfriado, confirmando a hipótese de que a criocapacitação reduz o tempo de vida dos espermatozóides (PARRISH & FOOTE, 1986; KEMP & SOEDE, 1997).

Além disso, os elementos do citoesqueleto celular são sensíveis à temperatura. A congelação de células pode gerar uma despolimerização prematura dos filamentos de actina (HALL et al., 1993). SPUNGIN et al., (1995) citam que a despolimerização do citoesqueleto do espermatozóide é um passo importante que permite a aproximação da membrana plasmática e da membrana acrossomal, promovendo excitose acrossomal. Provavelmente, este fato ocorrendo prematuramente, também contribui para a extrema desorganização de fusão de membrana após o resfriamento ou criopreservação (WATSON, 2000).

Em uma revisão sobre o processo de criopreservação de sêmen suíno, BAILEY et al. (2008) concluem que as fases de transição e as modificações na arquitetura das membranas dos espermatozóides durante o processo de resfriamento e congelação estão associadas com a perda de moléculas de

colesterol que iniciam algum evento intrínseco intracelular que leva ao processo parecido com a capacitação. A membrana plasmática dos espermatozoides de suíno são mais sensíveis ao choque térmico porque tem uma baixa proporção entre o colesterol e os fosfolípidos.

2.3.1.3. Adição e remoção de crioprotetores

A adição ou remoção de crioprotetores promovem um estresse osmótico transitório, porém substancial, à membrana plasmática do espermatozoide, dependendo da permeabilidade relativa deste crioprotetor (GAO et al., 1993). Normalmente o crioprotetor escolhido para aplicação em sêmen é o glicerol. As células espermáticas de suínos, em especial, apresentam um relativo grau de toxicidade ao glicerol. Devido a isso, baixas concentrações devem ser usadas, o que requer que estas células sejam congeladas mais rapidamente (MAZUR, 1977)

WATSON (2000) propõe que a proporção de células que sobrevivem ao protocolo de criopreservação é determinada pela sensibilidade ao estresse osmótico durante a adição e remoção do crioprotetor e durante o resfriamento e reaquecimento. Além de existir diferenças em relação a esta sensibilidade entre espécies, também é comum ocorrer dentro de espécies. É normal encontrar indivíduos dentro da espécie que apresentam melhor criotolerância, o que pode ser devido a certas características particulares de membrana que podem ser geneticamente determinadas.

Uma característica comum em espermatozoides criopreservados é o declínio da motilidade. Enquanto uma minoria de espermatozoides de uma amostra apresenta movimento progressivo vigoroso, a maioria exibe vários graus de declínio de motilidade. Este parece ser uma importante contribuição para a queda do potencial de fertilização quando estes espermatozoides são introduzidos no trato reprodutivo da fêmea pela inseminação artificial (WATSON, 2000).

Os efeitos que a criopreservação induz nos espermatozoides são muitos e vão desde danos letais até leves diminuições em sua função (WATSON, 2000).

Como conseqüência de todas estas mudanças que ocorrem com a célula espermática durante seu processo de congelamento, os principais danos produzidos podem ser: a) desidratação da membrana e dos componentes

intracelulares; perda da estabilidade da membrana lipídica e desnaturação das proteínas; b) danos na membrana celular devido à brusca saída de água; c) deformação na estrutura celular pela perda de volume; danos mecânico devido à formação de cristais de gelo no interior e exterior da célula; d) danos estruturais oxidativos aos componentes celulares e DNA (SÉLLES, 2001).

2.4. Requerimentos minerais em suínos sexualmente ativos.

As funções dos elementos minerais são muito diversas. Vão desde funções estruturais em alguns tecidos a uma grande variedade de funções de regulação em outros tecidos. Como a criação de suínos tem mudado para sistema de confinamento, tem-se aumentado a necessidade de administração de suplementos minerais e vitamínicos.

Em 1998, o National Research Council (NRC) publicou o mais recente dos requisitos nutricionais dos suínos. O NRC sugere os requerimentos mínimos para os distintos elementos nas diversas etapas do ciclo de vida. A tabela 1 apresenta a lista das necessidades estimadas para os suínos sexualmente ativos. O cumprimento dos requerimentos minerais é influenciado pela bio-disponibilidade dos ingredientes na ração (Nutrient Requirement of Swine: 10th Revised Edition, 1998).

Tabela 1. Dietas e Requerimentos Diários de Aminoácidos, Minerais, Vitaminas, e Ácidos Graxos de cachacos sexualmente ativos (90% de matéria seca).

| | Requerimentos | |
|--|------------------------|----------------|
| | kg da dieta | Quantidade/dia |
| DE conteúdo da dieta (kcal/kg) | 3,400 | 3,400 |
| ME conteúdo da dieta (kcal/kg) | 3,265 | 3,265 |
| DE ingestão (kcal/dia) | 6,800 | 6,800 |
| ME ingestão (kcal/dia) | 6,530 | 6,530 |
| Ração (kg/dia) | 2.00 | 2.00 |
| Proteína crua (%) ^b | 13.0 | 13.0 |
| | quantidade/kg da dieta | Quantidade/dia |
| Amino acids (total basis) ^b | | |
| Arginina | — | — |
| Histidina | 0.19 % | 3.8 g |
| Isoleucina | 0.35 % | 7.0 g |
| Leucina | 0.51 % | 10.2 g |
| Lisina | 0.60 % | 12.0 g |
| Metionina | 0.16 % | 3.2 g |
| Metionina + cisteína | 0.42 % | 8.4 g |
| Fenilalanina | 0.33 % | 6.6 g |
| Fenilalanina + tirosina | 0.57 % | 11.4 g |
| Treonina | 0.50 % | 10.0 g |
| Triptofano | 0.12 % | 2.4 g |
| Valina | 0.40 % | 8.0 g |
| Elementos Minerais | | |
| Cálcio | 0.75 % | 15.0 g |
| Fósforo, total | 0.60 % | 12.0 g |
| Fósforo, disponível | 0.35 % | 7.0 g |
| Sódio | 0.15 % | 3.0 g |
| Cloro | 0.12 % | 2.4 g |
| Magnésio | 0.04 % | 0.8 g |
| Potássio | 0.20 % | 4.0 g |
| Cobre | 5 mg | 10 mg |
| Iodo | 0.14 mg | 0.28 mg |
| Ferro | 80 mg | 160 mg |
| Manganês | 20 mg | 40 mg |
| Selênio | 0.15 mg | 0.3 mg |
| Zinco | 50 mg | 100 mg |
| Vitaminas | | |
| Vitamina A ^c | 4,000 IU | 8,000 IU |
| Vitamina D ₃ ^c | 200 IU | 400 IU |
| Vitamina E ^c | 44 IU | 88 IU |
| Vitamina K (menadiona) | 0.50 mg | 1.0 mg |
| Biotina | 0.20 mg | 0.4 mg |
| Cloro | 1.25 g | 2.5 g |
| Folacine | 1.30 mg | 2.6 mg |
| Niacina, disponível | 10 mg | 20 mg |
| Ácido Pantatênico | 12 mg | 24 mg |
| Riboflavina | 3.75 mg | 7.5 mg |
| Tiamina | 1.0 mg | 2.0 mg |
| Vitamina B ₆ | 1.0 mg | 2.0 mg |
| Vitamina B ₁₂ | 15 µg | 30 µg |
| Ácido Linoléico | 0.1 % | 2.0 g |

Nutrient Requirement of Swine: 10th Revised Edition, 1998

DE: Energia Digestível; ME: Energia Metabolizável.

Quando comparado com outras espécies animais ou mesmo suínos em outras fases de produção, pesquisas relacionadas especificamente com a suplementação de vitaminas e microminerais para cachaços são bastante limitadas (AUDET et al., 2004, MULLAN et al., 2006). Uma das razões para isto é que machos reprodutores representam uma pequena parte da população comercial de suínos. Outra razão é que os sistemas de produção utilizavam predominantemente monta natural e um ejaculado suíno produzia espermatozóides mais que suficientes para emprenhar uma única porca (ESTIENE & HARPER, 2005). Com a inseminação artificial se tornando cada vez mais utilizada, serão necessárias estratégias de manejo e nutrição para aumentar a fertilidade dos machos e qualidade do sêmen (ESTIENE et al., 2009).

Geralmente, assume-se que a formulação das dietas da fase de gestação de porcas supre as necessidades de energia, proteína, lisina e metionina para cachaços (CLOSE & ROBERTS, 1993). No entanto, a restrição alimentar imposta aos machos reprodutores é mais severa que aquela imposta às fêmeas gestantes (CLOSE & ROBERTS, 1993) o que pode limitar os suprimentos de micro nutrientes, entre os quais, vitaminas e microminerais necessários para que o animal pudesse manifestar todo o seu potencial reprodutivo (AUDET et al., 2004). Também se deve considerar que, na produção comercial de suínos, existem muitos fatores que podem interferir na biodisponibilidade de micro elementos fornecidos via dieta, entre eles: a) a presença de micotoxinas; interação entre minerais e vitaminas; b) estresse térmico; c) armazenamento inadequado de ingredientes que compõe a dieta, como alta temperatura e umidade, presença de metais pesados na dieta; d) doenças (ESTIENE, 2005). A biodisponibilidade de um elemento pode ser definida como a quantidade de um nutriente presente em uma determinada fonte que é absorvida para ser utilizada ou metabolizada por um animal (CLOSE, 2003).

Devido a estes fatores a suplementação extra de vitaminas e minerais pode apresentar resultados na qualidade do sêmen. Para muitas espécies animais, este tipo de suplementação leva a melhora na qualidade seminal, quantidade de sêmen ou ambos os parâmetros (EL-DARAWANY, 1990; FRANCHINI et al., 2001; YOSEF et al., 2003; MARIN-GUZMAN et al., 1997),

seja pela inativação de danos oxidativos ou interação com processo biológicos e enzimáticos. AUDET et al. (2004), em experimentos com suínos, afirmam que os nutrientes conseguidos via dieta são passados para o sangue e sêmen, com eficiência variada e podem ou não estar associadas com mudanças na função espermática.

Na nutrição de suínos, 14 minerais são considerados essenciais. Destes, seis são conhecidos como macrominerais (cálcio, sódio, fósforo magnésio, cloro e potássio) e estão envolvidos com os componentes estruturais e fluídos corporais dos suínos. Outros oito são conhecidos como microminerais (cobalto, cobre, iodo, ferro, manganês, selênio, enxofre e zinco) e são componentes ativadores de enzimas, coenzimas e hormônios do suíno (KOPINSKI, 2005).

A suplementação de minerais normalmente está associada à suplementação vitamínica (MARIN-GUZMAN et al., 1997; MARIN-GUZMAN et al., 2000). As vitaminas normalmente desempenham papel como antioxidante celular.

2.4.1. Minerais e vitaminas para cachaços

2.4.1.1. Minerais e minerais quelatados

Sais tais como sulfatos, carbonatos e óxidos são tradicionalmente adicionados as dietas com o objetivo de suprir as necessidades do animal para a produção (HENMAN, 2001; CLOSE, 2003). Estes sais são quebrados no trato digestivo e formam íons livres que podem formar complexos com outras moléculas da dieta, dificultando sua absorção. Estes íons são muito reativos e sua interação com vários minerais da dieta devem ser levados em conta na definição de um programa nutricional adequado (MULLAN et al., 2006). Os minerais quelatados são menos reativos e apresentam maior biodisponibilidade (MULAN et al., 2006).

2.4.1.2. Selênio (Se) e vitamina E

O selênio (Se) é essencial para o desenvolvimento normal dos espermatozóides, já que é incorporado na membrana protéica mitocondrial. Também é um componente da enzima glutathione peroxidase, que protege os componentes celulares de radicais livres e atua como antioxidante protegendo

as membranas celulares lipídicas dos danos provocados pela peroxidação lipídica (HANSEN & DEGUCHI, 1996; KOPINSKI, 2005). Em geral, pesquisas tem demonstrado que a administração de suplementos de Se em suínos aumenta as concentrações da glutathione peroxidase e as concentrações de Se nos espermatozoides, no plasma seminal, na circulação, rim, fígado, coração, músculo esquelético, testículo, epidídimo, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais (MARÍN-GUZMÁN et al., 1997; SEGERSON et al., 1981). No entanto, KOLODZIEJ & JACYNO (2005) observaram que a adição do Se diminui a glutathione peroxidase no plasma seminal.

Os sinais de deficiência de Se no campo podem estar associados a diversas doenças e disfunções como morte súbita, doença do músculo branco, necrose hepática, doença do coração de amora, edema intestinal e diarreia em leitões desmamados, além de alteração de algumas funções reprodutivas. A crescente adoção de sistemas intensivos de confinamento para animais reprodutores resulta no aumento na ocorrência de deficiência de alguns minerais como o Se. A deficiência de Se em fêmeas é acompanhada por redução de fertilidade, aumento no número de natimorto e leitões mais fracos. Após o desmame e maior perda de porcas no rebanho e nos machos a deficiência de Se diminui a produção de sêmen, a morfologia dos espermatozoides e a fecundidade.

Para suínos machos, dietas com níveis inadequados de Se e vitamina E podem resultar em redução da motilidade dos espermatozoides e alta incidência de anormalidades estruturais nestas células (MARIN-GUZMAN et al., 1997).

BROWN & BURK (1973) e CALVIN (1979) relataram que a maior parte do Se injetado em ratos se localizava na peça intermediária do espermatozoide, sugerindo que o mineral deve estar envolvido na manutenção da integridade estrutural e função locomotora do gameta masculino.

Muitos experimentos foram conduzido para investigar os efeitos da suplementação por Se nas características reprodutivas em cachacos (SEGERSON et al. 1981; GUZMÁN-MARÍN et al., 1997, 2000; JACYNO, 2002; KOLODZIEJ & JACYNO, 2004) e existem fortes evidências que sustentam a inclusão deste mineral nas dietas dos machos. Melhoras na produção espermática, morfologia dos espermatozoides e fertilidade foram encontradas

quando os animais receberam o mineral de forma inorgânica, normalmente em níveis de 0,5 ppm (MARIN-GUZMAN et al., 1997; 2000). LIU et al. (1982) sugeriram que a deficiência de Se prolongada em cachaaos poderia resultar em diminuição da concentração e motilidade espermáticas, além de aumentar a incidência de gotas citoplasmáticas.

Fontes quelatadas de Se são mais eficientemente aproveitadas que inorgânicas para suínos (MAHAN & PARRETT, 1996). ESTIENE et al. (2009), usando uma fonte comercial de Se orgânico na dieta de cachaaos encontraram melhora na motilidade e capacidade de fertilização dos espermatozóides quando comparado com machos que receberam fonte inorgânica de Se (Selenito de Sódio) ou os que não receberam suplementação. Na realidade, sais, tais como sulfatos, carbonatos e óxidos são quebrados no trato digestivo e formam íons livres que podem formar complexos com outras moléculas da dieta, dificultando sua absorção. Estes íons são muito reativos e sua interação com vários minerais da dieta devem ser levados em conta na definição de um programa nutricional adequado (MULLAN et al., 2006). Os minerais quelatados são menos reativos e apresentam maior biodisponibilidade (MULAN et al., 2006). No entanto, JACYNO et al. (2002), avaliando fontes orgânicas e inorgânicas de Se aliadas a vitamina E em cachaaos, não encontraram efeito dos tratamentos sobre a motilidade ou volume do ejaculado, porém, a concentração espermática foi maior quando os animais foram suplementados com a fonte quelatada de Se. A porcentagem de espermatozóides com acrossomos normais foi maior para a fonte orgânica, que também diminuiu a porcentagem de espermatozóides com anormalidades morfológicas, o que poderia explicar a maior capacidade de fecundação observada por ESTIENE et al., (2005).

A associação de Se e vitamina E é comum em muitos trabalhos e nem sempre é possível separar os efeitos do mineral e da vitamina. BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al. (1995) sugerem que a vitamina E pode atuar como um antioxidante no sêmen de suínos. O processo oxidativo pode resultar em uma diminuição da motilidade espermática.

MARIN-GUZMAN et al. (1997), usaram dietas com concentrações de Se inorgânico de 0 a 0,5 ppm e vitamina E de 0 a 220 UI/kg de dieta em cachaaos para avaliar, entre outros parâmetros, a qualidade do sêmen e sua taxa de

fertilização. Os autores concluíram que dietas com baixos níveis de Se e vitamina E provocam redução da motilidade espermática e a porcentagem de espermatozóides anormais aumenta. Não encontraram efeito da suplementação no volume ou concentração espermática. Para os machos suplementados com Se, foi encontrado aumento da concentração de Se no sêmen e da atividade da enzima glutathiona peroxidase e a diminuição de incidência de gotas citoplasmáticas, bem como espermatozóides sem cauda ou com anormalidades na cauda. Em relação à taxa de fertilização, os números de oócitos fertilizados pelo grupo de cachorros que receberam a dieta sem suplementação de selênio foi menor. O espermatozóide suíno contém glutathiona peroxidase e α -Tocoferol, o que indica que ambos têm importância na prevenção dos danos peroxidativos da célula espermática.

Em outro experimento, MARIN-GUZMAN et al. (2000), usando as mesmas dietas de 1997, avaliaram a morfologia estrutural e a concentração de ATP dos espermatozóides suínos. Também testaram a adição de selenito de sódio diretamente ao diluidor do sêmen. Os animais alimentados com a dieta pobre em Se apresentaram anormalidades estruturais na mitocôndria, sendo estas mais ovais, com a morfologia da cauda anormal e diminuição da concentração de ATP no espermatozóide. Estes efeitos em conjunto podem reduzir a motilidade espermática e diminuir as taxas de fertilização. Devem existir vários mecanismos antioxidantes funcionais nos espermatozóides ou no sêmen suínos que contribuem para manter a integridade da membrana. A adição do selenito de sódio é prejudicial, diminuindo a motilidade espermática.

Foi demonstrado que amostras de sêmen com alta viabilidade após o processo de congelação e descongelação era caracterizada por alta atividade de superóxido dismutase (SOD) e alta proporção de atividade da enzima glutathiona peroxidase, dependente de Se, após a congelação (CEROLINE et al., 2001).

Acredita-se que a vitamina E tenha papel fundamental no processo de espermatogênese (MASON, 1957; MARIN-GUZMAN et al., 1997). Deficiência de vitamina E pode causar degeneração testicular em ratos, cachorros, gatos, suínos e macacos e pode provocar um baixo número de células germinativas e conseqüente redução na produção espermática (MASON, 1926, 1940; MASON & MANER, 1957; COOPER et al, 1987). A vitamina E parece não ter efeito

sobre as anomalias estruturais nos espermatozóides, mas provavelmente serve como antioxidante nas células espermáticas (MARÍN-GUZMÁN et al., 2000; BRZEZINSKA-STEBOZINSKA et al., 1995).

CEROLINI et al. (2000) demonstraram que a vitamina E é capaz de prevenir danos oxidativos nas membranas espermáticas do sêmen de suínos. PEÑA et al., (2003), usando vitamina E (100 μ Mol e 200 μ M – Trolox) adicionado ao diluente de sêmen suíno, encontraram aumento significativo da motilidade espermática após descongelação na concentração maior da vitamina. SATORRE et al. (2009) conseguiram reduzir a criocapacitação que o espermatozóide suíno sofre com o processo de congelação e descongelação pela adição de vitamina E no diluente de congelação.

2.4.1.3. Cálcio (Ca^{2+}) e fósforo (P) e vitamina D

O fósforo (P) e o cálcio (Ca^{+}) desempenham um papel muito importante no desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético, além de realizar muitas outras funções fisiológicas. CROMWELL et al., (1998) indicaram que a nutrição adequada de Ca^{2+} e P para todas as classes de suínos é dependente de: (1) uma oferta adequada de cada elemento disponível na dieta (2), uma proporção adequada de Ca^{2+} e P disponível na dieta, e (3) a presença adequada de vitamina D, já que a absorção dos dois minerais é dependente desta vitamina (HANCOCK et al., 1986; JONGBLOED, 1990). Dentro da reprodução, existem informações de que, se administrados na fase de crescimento do animal, contribuem para a longevidade reprodutiva (KOPINSKI, 2005).

A função primária do P inclui a mineralização dos tecidos conjuntivos, função e estrutura dos ácidos nucleicos, transporte de energia pelo diéster fosfato, componentes estruturais dos fosfolípidos e balanço osmótico (LEWIS, 2000).

A atividade da vitamina D é perdida pela exposição à luz ultravioleta e peroxidação pelos radicais livres formados pelos ácidos graxos poliinsaturados. A destruição oxidativa da vitamina se dá por calor, e alguns microelementos. O suíno não requer fontes dietéticas de vitamina D, pois é capaz de sintetizá-la

pela pele. No entanto, em condições de alojamento confinado, a suplementação se torna interessante (LEWIS, 2000).

O cálcio é o metal iônico mais abundante e um dos mais importantes elementos constitucionais do organismo e da fisiologia celular, sendo que suas funções podem ser divididas em extra e intracelular, dependendo do seu sítio de ação (GILMAN et al., 1991). O Ca^{2+} intracelular no espermatozóide tem um papel fundamental no processo de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fertilização. Além disso, o Ca^{2+} intracelular é o principal elemento para a motilidade flagelar e a fusão da vesícula acrossomal (DARSZON et al., 1999; TONIOLLI & COMBARNOUS, 1999). No sítio de fecundação, o espermatozóide apresenta um movimento flagelar típico, conhecido como motilidade hiperativada. O Ca^{+} tem função importante na regulação desta motilidade (SUAREZ & HO, 2003; NISHIMURA, 1993), mas pouco se sabe sobre a sua atuação. A membrana plasmática apresenta canais de Ca^{2+} voltagem-dependente que iniciam e mantêm o aumento intracelular deste íon na hiperativação (BOOTMAN et al, 2001).

LIMA et al., (2006), avaliando a adição de diferentes dosagens de cloreto Ca^{2+} no sêmen suíno concluíram que as amostras que receberam maiores níveis (5,0 e 7,0 mMol) apresentaram motilidade espermática melhor e não encontraram diferenças quanto ao vigor espermático.

2.4.1.4. Zinco (Zn)

O Zn é componente das metaloenzimas, incluindo as DNA e RNA sintetases e transferases, enzimas digestivas e insulina. É importante no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (KOPINSKI, 2005). É considerado um mineral crítico para a função reprodutiva de cachorros, estando envolvido na condensação dos cromossomos. Sua via de atuação não está bem definida, porém acredita-se que seja, nos resíduos de protamina 2 (BERTELSMANN et al., 2007). As protaminas 1 e 2 são transcritos gênicos encontrados nos espermatozóides de várias espécies animais que estão envolvidas no processo de condensação nuclear (CARREAU et al., 2007).

LIAO et al., (1985), suplementando cachorros com diferentes níveis de Zinco (Zn) (32, 89, 146 e 197 ppm) encontraram uma maior produção de espermatozóides nos animais que receberam os níveis mais altos, porém não

encontraram efeito do tratamento sobre o total de espermatozoides com anormalidades morfológicas.

LIPTRAP et al. 1970, reportou que cachaaos tm maior exigncia de Zn do que as fmeas e os machos jovens. No entanto, a quantificaaõ do requerimento de Zn para machos na estã bem estabelecida, especialmente durante épocas de colheita de smen intensas. Atrofia dos tbulos seminferos e do epitlio germinal testicular acompanhada de um retardo no desenvolvimento de testculos, epididimo, próstata de glândula pituitãria foram observadas em machos de diferentes espécies (MASON, 1982). WEGGER & PALLUDAN (1977) encontraram degeneraaõ do testculo, ausncia de espermatogênese, aumento do tecido conectivo das células de Leydig em cachaaos alimentados com uma dieta pobre em Zn por 10 semanas.

2.4.1.5. Cobre (Cu)

O Cobre (Cu) tem propriedades antioxidantes. A enzima superoxido dismutase (SOD), que depende de Cu e Zn, é encontrada no plasma e fluidos extracelulares, mas não é a mesma SOD encontrada nas mitocôndrias. Durante tempos em que superóxidos são gerados nas células, tais como, distúrbios metabólicos causados por drogas, insultos ambientais, aumentos metabólicos, a SOD é essencial para transformar o radical superóxido em peróxido e dióxigênio (LEWIS et al., 2000). Além disto, na mitocôndria, a última enzima da cadeia de transporte de elétrons é a citocromo oxidase. Ela reduz o oxigênio a água e, com outras enzimas da cadeia, permite a formaçaõ do ATP. A atividade desta enzima, Cu e Fe dependente reflete no metabolismo e funçaõ respiratória dos tecidos (LEWIS et al., 2000). Existem muitos estudos sobre o papel do Cu para fmeas suínas, mas não para reprodutores.

Foi demonstrado que amostras de smen com alta viabilidade após o processo de congelaçaõ e descongelaçaõ são caracterizadas por alta atividade de superoxido dismutase (SOD) (CEROLINE et al., 2001).

2.4.1.6. Magnésio (Mg)

É co-fator de muitos sistemas enzimáticos e também faz parte da constituicãõ dos ossos. Parece não ter efeito sobre a reproduçaõ (KOPINSKI, 2005). O Mg é importante na transmissãõ de impulsos nervosos. Ele estabiliza

a estrutura do ATP e tem papel fundamental em mais de 300 sistemas enzimáticos incluindo a iniciação de β -oxidação das gorduras, ativação de aminoácidos na síntese protéica, síntese e degradação de DNA e formação de cAMP. O requerimento de Mg por suínos não está bem definido. Para o rebanho reprodutivo não existem dados de requerimento definidos (LEWIS et al., 2000).

2.4.1.7. Cobalto (Co)

É componente da vitamina B12 (KOPINSKI, 2005). A vitamina B12 atua como coenzima em diversas reações químicas biológicas (McDOWELL,), no entanto seu papel na reprodução não está bem definido. Existem evidências de que atua em algumas funções espermáticas (WATSON, 1962). De fato, a deficiência de vitamina B12 durante a gestação e lactação afeta o futuro sistema reprodutivo dos machos e inibe a maturação de células espermáticas em ratos (WATANABE et al., 2003). AUDET et al. (2009), quando da administração de suplemento vitamínico contendo vitamina B12 em cachos encontrou um acúmulo deste no plasma seminal. Os autores concluíram que a vitamina B₁₂ é um componente essencial para a espermatogênese. FURLAN et al., (2007) citam que a vitamina B₁₂, dentre outras vitaminas, tem papel importante nos processo de metilação de bases de DNA.

MAHAN et al., (2002), quando suplementaram cachos com fontes orgânicas de cromo, cobre, zinco e manganês por um ano, conseguiram aumento de 10,9 para 23,4 doses por ejaculado.

2.4.1.8. Vitaminas e sêmen

AUDET et al. (2004) conseguiram aumento na produção de sêmen de suínos suplementando os machos com quantidades extras de vitaminas solúveis em água (colina; ácido pantotênico; riboflavina; ácido fólico; niacina; tiamina; piridoxina; vitamina B12; biotina) ou lipossolúveis (vitamina A; vitamina D3; vitamina E), quando os animais foram submetidos a um ritmo de coleta de sêmen intenso. O tratamento com vitaminas solúveis em água se mostrou mais eficiente no aumento da produção espermática que o com vitaminas lipossolúveis, porém os dois tratamentos foram superiores em relação ao

controle que só recebia vitamina C. No entanto, em outro experimento, AUDET et al. (2009), avaliando uma dieta controle e uma suplementada com as mesmas fontes de vitaminas lipossolúveis e solúveis em água para cachaços, não encontraram efeito do tratamento sobre a produção ou qualidade espermática. Os resultados da suplementação de vitaminas são bastante controversos.

As alterações apresentadas em parâmetros quantitativos ou qualitativos do sêmen de suínos devido a adição de vitaminas e minerais, tanto via dieta como no diluente no momento da manipulação podem levar a alterações de expressão gênica (JEONG et al., 2009). Os autores avaliaram o efeito da adição de α -tocoferol (vitamina E) no diluente de sêmen suíno sobre a expressão da proteína do estresse (HSP 70) e expressão dos genes pró-apoptóticos (Bax e Bak) e anti-apoptóticos (Bcl-2l e Bcl-xl) no espermatozóide.

Inúmeros experimentos têm sido desenvolvidos com o propósito de melhorar a qualidade do sêmen de suínos após o processo de congelação. Entre as várias tentativas estão: mudanças no protocolo de criopreservação (ERIKSON, 2000; HOLT et al., 2005; CARVAJAL et al., 2004; KRATZER et al., 2005); adição de vitaminas no sêmen no momento de sua manipulação (PEÑA et al., 2003; JEONG et al., 2009; TONIOLLI & COMBARNOUS, 1999; LIMA et al., 2006); alteração da dieta dos cachaços pela administração de suplementos vitamínicos (AUDET et al., 2004; AUDET et al., 2009); suplementação de minerais (MARIN-GUZMAN et al., 1997; MARIN-GUZMAN et al., 2000; SEGERSON et al., 1981; JACYNO, 2002; LIU et al., 1982; ESTIENE, 2009; CEROLINI et al., 2001; LIAO et al., 1985; WEGGER & PALLUDAN, 1977). No entanto, os resultados tem se apresentado contraditórios. Não existe na literatura estudos que avaliem os efeitos da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais na produção e qualidade do sêmen de cachaços. Além disto, a suplementação normalmente utilizada é com minerais não quelatados, que são mais reativos e apresentam menor biodisponibilidade.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

3.1. Avaliar o efeito das suplementações intramuscular com vitaminas e minerais na motilidade, vigor, reação ao teste hiposmótico, à coloração Azul de Tripán/Gimsa e morfologia espermática do sêmen *in natura* de cachaaos;

3.2. Avaliar o efeito das suplementações intramuscular com vitaminas e minerais, na motilidade, vigor, reação ao teste hiposmótico à coloração Azul de Tripán/Gimsa e morfologia espermática após a congelação do sêmen de cachaaos.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

O experimento foi realizado na suinocultura de produção comercial de suínos da linhagem Topigs, denominada Sítio Estiva, durante o período de Agosto a Dezembro de 2009. A suinocultura em questão está localizada no município de Jaboticabal no estado de São Paulo.

Foram utilizados dez machos, avaliados previamente em relação à qualidade de seu sêmen. Os animais se encontravam alojados em baias individuais, com piso de concreto e teto de telhas de fibrocimento.

4.1. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram divididas em duas fases: a primeira fase foi exploratória envolvendo técnicas multivariadas para compreender a estrutura de grupos contida nos dados e a segunda foi a análise de variância utilizando o modelo inteiramente casualizado em que se avaliou o sêmen *in natura* e após descongelação por períodos e por fases (sem e com suplementação). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey admitindo um nível de significância de 5%.

4.1.1. Fase exploratória

As análises multivariadas de agrupamento por método não hierárquico (método k-médias) e componentes principais, foram aplicadas às características espermáticas (turbilhonamento, motilidade, vigor, porcentagem de espermatozóides vivos íntegros, vivos sem acrossoma e mortos, espermatozóides com cauda reta e com cauda enrolada e morfologia) no sêmen *in natura* e pós-descongelação das fases com e sem suplementação. Os dados foram padronizados o que resultou em média nula e variância unitária para todas as características espermáticas. A não-padronização poderia levar a inconsistências nas soluções das duas técnicas, já que a maioria das medidas de distância é bastante sensível a diferentes escalas ou magnitudes das variáveis. Essas análises estatísticas foram classificadas no contexto das análises multivariadas como técnicas de interdependência, nas quais nenhuma variável é definida como independente ou dependente, pois o

processo envolve a análise simultânea de todas as variáveis em conjunto, e foram realizadas com o auxílio do software Statística (STATSOFT, 2004).

O método k-médias busca a melhor solução na divisão de grupos, de tal modo que a semelhança dentro de grupos e as diferenças entre grupos sejam máximas (REIS, 2001; PÉREZ, 2001; HAIR et al., 2005).

O algoritmo geral do método pode ser assim descrito:

- a) escolher k distintos valores para centros dos grupos. Podem ser utilizadas k variáveis aleatórias para assumir cada centro inicial dos grupos, ou pode-se usar uma pequena parte dos dados para calcular centros iniciais dos grupos;
- b) associar cada ponto ao centro mais próximo;
- c) recalculando o centro de cada grupo;
- d) repetir os passos b) e c) até não haver alterações.

A estrutura classificatória das características espermáticas foi K=2 e K=4. Como medida de similaridade entre os grupos, foi utilizada a distância euclidiana num espaço de sete dimensões, que corresponde às características espermáticas estudadas.

A distância euclidiana num espaço multidimensional pode ser assim descrita:

$$d(x,y) = \{ \sum_i (x_i - y_i)^2 \}^{1/2}; \text{ em que:}$$

$$d(x,y) = \text{distância entre objetos } x \text{ e } y$$

$$\sum_i = \text{somatório de } i \text{ dimensões}$$

A partir dos grupos gerados pelo método de agrupamento k-médias, as características seminais (turbilhamento, motilidade, vigor, porcentagem de espermatozoides vivos íntegros, vivos sem acrossoma e mortos, espermatozoides com cauda reta e com cauda enrolada e morfologia) foram codificados conforme o grupo pertencente (2 e 4) e, então, foi aplicada a técnica de componentes principais (HAIR et al., 2005), utilizando as mesmas características seminais citadas inicialmente com o intuito de visualizar a distribuição dos grupos do sêmen no plano bidimensional formado por componentes principais bem como interpretar o poder discriminatório das características seminais em cada componente principal, conforme:

$$r_{xj} (CP_h) = \frac{a_{jh} \sqrt{\lambda_h}}{s_j}; \text{ em que:}$$

S_j = desvio-padrão da variável j ;

a_{jh} = coeficiente da variável j no h -ésimo componente principal;

λ_h = autovalor h ;

r_{xj} (CP_h) = correlação da variável x_j com o h -ésimo componente principal.

Os autovetores (CP_1, CP_2, \dots, CP_h) foram construídos a partir dos autovalores da matriz de covariância das características seminais em ordem decrescente; sendo assim, o CP_1 é o componente que retém mais variabilidade do conjunto original dos dados, enquanto o último componente retém menos.

A variância retida em cada componente principal pode ser calculada da seguinte forma:

$$CP_h = \frac{\lambda_h}{\text{traço}(C)} \times 100 ; \text{ em que:}$$

CP_h = componente principal h ,

λ_h = autovalor h ;

C = matriz de covariância e $\text{traço}(C) = \lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_n$.

4.2. Delineamento experimental

O sêmen dos cachaaos foi coletado pela técnica da mão enluvada em recipiente estéril, coberto por filtro próprio e protegido por copo térmico. Foi utilizado o ejaculado total após a separação da fração gelatinosa. Um total de dez machos, de mesma linhagem, com idades entre 1,5 a três anos fez parte do experimento.

O experimento foi dividido em duas fases, com o objetivo de avaliar as diferenças na qualidade espermática de sêmen *in natura* e congelado em cada cachaaço antes e após das suplementações injetáveis vitamínico mineral comercial, fornecida pela empresa FormilVet Ltda. Na primeira fase do experimento, antes das suplementações dos machos, 10 cachaaços tiveram seu sêmen coletado e avaliado *in natura* quanto ao volume, concentração, turbilhamento, motilidade, vigor espermático, porcentagem de espermatozoides vivos, mortos, condição acrossomal por método de coloração e a morfologia e integridade da membrana (HO). Estas mesmas amostras de sêmen foram

submetidas ao protocolo de congelação, descrito por SARAIVA et al., (2005). Após 15 dias da congelação, as amostras foram descongeladas e avaliadas novamente, quanto aos parâmetros acima citados. O sistema de coleta realizado nesta fase do experimento foi de três coletas de cada macho com intervalo de descanso de aproximadamente quatro dias entre coletas, totalizando 30 amostras de sêmen.

Na segunda fase do experimento, os mesmos 10 cachorros foram divididos em dois grupos um com sete animais e outro com três, escolhidos aleatoriamente (figura 1). O primeiro grupo recebeu uma dose de 1mL/100kg de peso vivo do suplemento vitamínico mineral comercial Selen-Fos[®] e uma dose de 1mL/15kg de peso vivo do suplemento vitamínico mineral comercial Zimag[®], aplicados via intramuscular (SCALP n.º. 10). As composições dos produtos foram: Selen-Fos^{®1} -: 0,375g de selenito de sódio; 6.000.000 UI vitamina D2; 25000 UI vitamina E; 20g de glicerol fosfato de sódio; 15g de fosfato tricálcico, em cada 100 mL de produto e Zimag^{®2} - 30g de lactobionato de magnésio; 15g de lactobionato de cálcio; 8g de lactobionato de zinco; 1g de lactobionato de cobre; 0,5g de lactobionato de cobalto; 0,45g de lactobionato de manganês; 5g de glicerofosfato de sódio em 100 mL do produto, constituindo o grupo tratado. Outros três machos não receberam as suplementações e foram usados como testemunhas. Durante 60 dias, o sêmen destes animais não foi avaliado, constituindo este o período de adaptação. Este período foi considerado para que fosse possível que o produto testado tivesse seu máximo efeito nas características seminais, uma vez que a espermatogênese e o transporte no epidídimo levam 34 e 10 dias, respectivamente (SHARIF et al., 1998).

O sistema de coleta realizado nesta fase do experimento foi de três coletas de cada macho com intervalo de descanso de aproximadamente quatro dias entre coletas, totalizando 30 amostras de sêmen, sendo 21 amostras dos machos tratados e nove amostras dos machos testemunhas. Todas estas amostras foram avaliadas *in natura* e após congelação (figura 1).

^{1,2} FormilVET Ltda.
WWW.formil.com.br

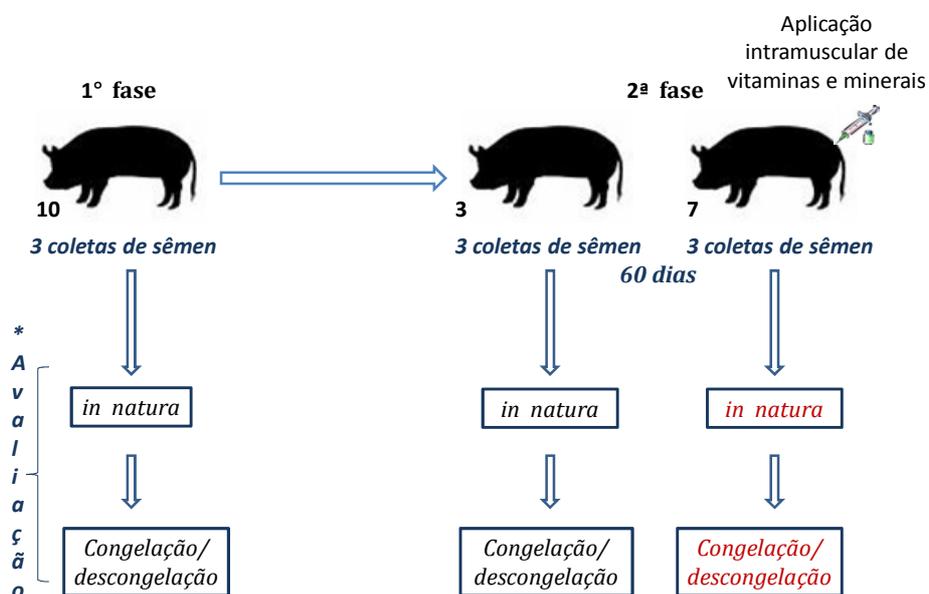


Figura 1. Desenho representativo do delineamento experimental para análise do efeito da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a criopreservação do sêmen de cachaaos.

As dietas dos grupos controle e tratado foram às mesmas, compostas principalmente por milho, farelo de soja, farelo de trigo, para minimizar um possível efeito da dieta sobre o resultado do experimento. A água foi fornecida á vontade. A Tabela 2 apresenta a composição nutricional da dieta dos machos.

Tabela 2: Composição da dieta de manutenção dos cachaços

| Nutrientes | Quantidade |
|---|-------------|
| Proteína Bruta | 15% |
| Extrato etéreo | 2,0% |
| Fibra Bruta | 7,0% |
| Cálcio | 1,0% |
| Fósforo Total | 0,45% |
| Vitamina C | 210mg/kg |
| Ferro | 85mg/kg |
| Manganês | 50mg/kg |
| Vitamina B12 | 33,55mcg/kg |
| Cobre | 95mg/kg |
| Vitamina A | 20.125UI/kg |
| Zinco | 283mg/kg |
| Cromo | 0,2mg/kg |
| Metionina | 1.485mg/kg |
| Vitamina E | 144mg/kg |
| Vitamina D | 5.032UI/kg |
| Lisina | 1.317mg/kg |
| Vitamina K3 | 4,42mg/kg |
| Iodo | 1,4mg/kg |
| Ácido fólico | 1,93mg/kg |
| Selênio | 0,8mg/kg |
| Cobalto | 0,176mg/kg |
| Colina | 600mg/kg |
| Biotina | 0,20mg/kg |
| Niacina | 26,164mg/kg |
| Vitamina B1 | 2,6838mg/kg |
| Vitamina B6 | 2,6838mg/kg |
| Vitamina B2 | 5,1526mg/kg |
| Energia Metabolizável Suínos Kcal/Kg | 2.944,91 |

4.3. Protocolo de congelação do sêmen

As amostras retiradas foram avaliadas e submetidas à congelação segundo protocolo descrito por SARAIVA et al. (2005). O sêmen foi deixado em repouso durante 90 minutos à temperatura ambiente (20 – 22°C). Após este tempo foi feita a primeira diluição (1:1, v/v) na solução Beltsville (BTS (+) IMV, L'Aigle, França). O sêmen já diluído foi deixado em repouso numa centrífuga refrigerada à temperatura fixa de 16°C durante três horas. Em seguida, foi centrifugado a 800g durante 6 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-diluído para avaliação da motilidade e vigor da fração restante foram avaliados novamente. Esta fração de sêmen foi diluída pela segunda vez com Lactose gema de ovo (LEY) (80 mL [80% (v / v) 310 mM] β-lactose + 20 mL de gema de ovo) na proporção de 2:1 (duas partes de diluente para uma parte de sêmen). Após a minuciosa mistura, o sêmen foi resfriado a 5°C por duas horas em centrífuga refrigerada. A esta temperatura o sêmen foi lentamente misturado com um terceiro diluente constituído por 89,5 mL de LEY, 9 mL de glicerol e 1,5 mL de Equex STM (Venda Nova Chemicals Inc., Scituate, MA, E.U.A.), que é equivalente a Orvus Es Cole (GRAHAM et al., 1971); uma proporção de duas partes do sêmen para uma parte do diluente, dando uma concentração final de 3% de glicerol. Após a estas diluições a concentração espermática foi de 600×10^6 .

Os espermatozoides assim diluídos foram acondicionados em palheta de 0.5 mL a 5°C em uma câmara fria. Após o acondicionamento, todas as palhetas foram transferidas para um recipiente contendo Nitrogênio, permanecendo a 3 cm de altura por 20 minutos para terem contato apenas com o vapor de nitrogênio. As taxas de refrigeração ou congelação foram às seguintes: 3°C / min a partir de 5°C a -5°C, 1 minuto para congelação e, em seguida, 50°C / min de -5°C a -140°C. As amostras foram imersas no Nitrogênio (-196°C) para o armazenamento.

Estas amostras foram descongeladas em banho-maria por 12 segundos, a 52°C e avaliadas quanto às porcentagens de espermatozoides móveis, vigor, porcentagem de espermatozoides vivos, mortos, e condição acrossomal.

4.4. Avaliação da qualidade espermática

Para a análise da motilidade dos espermatozóides foram utilizados os critérios propostos por KRAUSE (1996). Uma gota de sêmen é colocada sobre uma lâmina aquecida (38° - 40°C) e recoberta com uma lamínula, analisando-as posteriormente por microscopia de luz em uma ampliação de 200X. A escala percentual utilizada foi de 0 a 100. Para a avaliação do turbilhonamento também uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina aquecida (38° - 40°C) analisando o movimento massa da gota, segundo a escala de 0 a 5. A concentração foi determinada em câmara de Neubauer. O número total de espermatozóides por ejaculado foi calculado pela multiplicação do volume do sêmen livre de gel e a concentração espermática. O vigor foi avaliado segundo escala de 0 a 5, com base na metodologia proposta por SCHEID (1993).

As porcentagens de espermatozóides vivos ou mortos, bem como a condição acrossomal foram avaliadas utilizando-se o método de coloração vital Azul de Tripán/Giemsa descrito por KOVACS e FOOTE (1992). Uma alíquota de 20 µL de cada coleta foi colocada em um microtubo com capacidade de 1,5 mL adicionado 20 µL de Azul de Tripán 0,4% e incubada em banho-maria seco a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 1 mL de água destilada foi adicionado à suspensão e centrifugada a 700G por 5 minutos para retirada do excesso de corante. Foram feitas duas lavagens de cada amostra. Depois de retirado o sobrenadante, a amostra foi ressuspensa com 0,5 mL de água destilada e foram feitos dois esfregaços, que, após secos em fluxo de ar, foram fixados em metanol por 5 minutos. Após a secagem destes esfregaços, os mesmos foram mergulhados em solução Giemsa 10% onde permaneceram por um período de 18 a 20 horas.

Os esfregaços foram analisados em microscópio binocular de 1000X de aumento, sem contraste de fase. Duzentos espermatozóides por lâmina foram identificados e divididos nas seguintes classes distintas: 1) vivo intacto (VI); 2) vivo sem acrossomo (VSA); 3) morto (M). Os espermatozóides com coloração rósea foram identificados como vivos e os de coloração azulada como mortos. O acrossomo foi classificado como íntegro quando apresentou coloração rósea mais forte.

O teste de morfologia avalia o número de espermatozóides morfologicamente normais. Existe uma ampla lista de anormalidades

espermáticas, mas neste trabalho foram destacadas as descritas por BORTOLOZZO & WENTZ (2005):

- Gota citoplasmática: proximal e distal;
- Anormalidades da cauda: cauda em laço ou cauda em aglutinação (emaranhado);
- Alterações da cabeça: macrocefalia, microcefalia, cabeças soltas, cabeças piriformes, cabeças dobres, etc;
- Outras alterações: implantações anormais da cauda, caudas dobres, etc.

Para realizar estas análises de morfoanomalias, os espermatozóides foram fixados em SSF e posteriormente avaliados em microscópio de contraste de fase com objetiva de 1000X.

O processo do teste HO desenvolvido por LECHNIAK et al. (2002) foi utilizado neste experimento, onde 100 µL de sêmen foram adicionados em 1 mL de solução hiposmótica (0,49 g de citrato de sódio x 2H₂O e 0,9 g de frutose em 100 mL de água Miliq, com base osmótica 100 mOs/kg), incubada por 40 minutos a 37°C. Foram avaliadas as proporções de espermatozóides com caudas enrolada e reta, em microscopia óptica, utilizando-se do contraste de fase com aumento de 40X, contando um total de 200 espermatozóides. A cauda reta foi indicativa de ruptura de membrana e a enrolada de integridade de membrana.

5. RESULTADOS

Na Figura 2, observa-se o perfil das médias das características seminais (motilidade, vigor, porcentagem de espermatozóides vivos íntegros, vivos sem acrossoma e mortos, espermatozóides com cauda reta e com cauda enrolada) em cada um dos dois grupos construídos pelo método k-médias. Pode-se observar que as médias das variáveis motilidade, vigor, AT-VI e HO-Enrolado do sêmen *in natura* são superiores em relação às do sêmen descongelado, indicando a melhor qualidade espermática no sêmen *in natura*; e as características AT-VSA, AT-M e HO-Tur, por possuírem médias inferiores na fase pós-descongelação indicam má qualidade espermática.

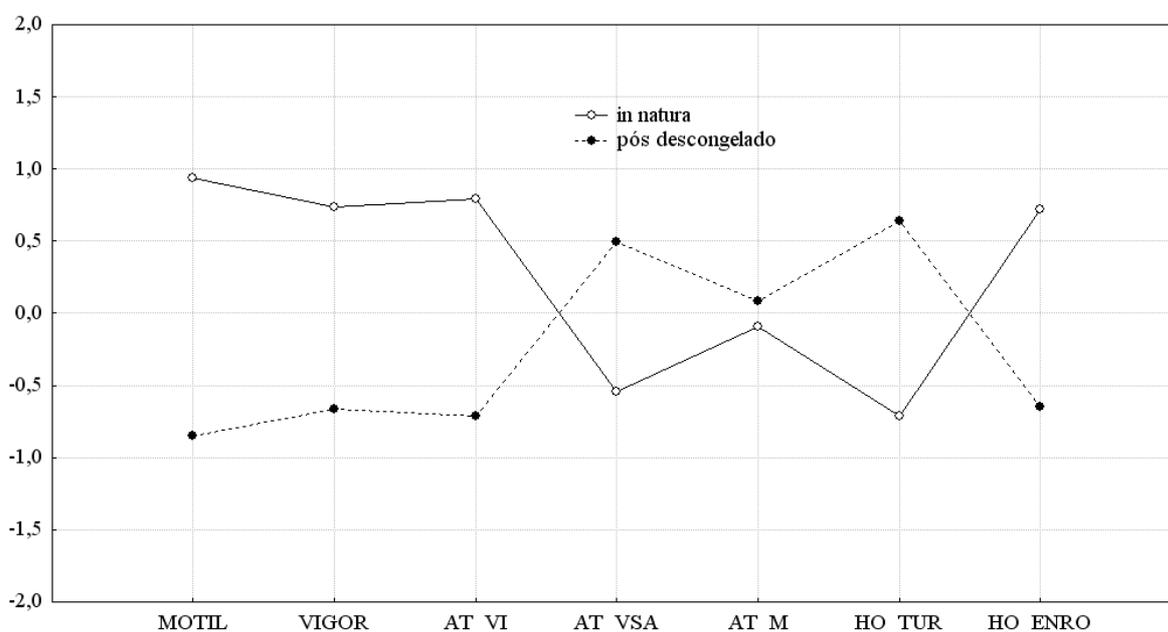


Figura 2. Perfil de médias das características seminais para os dois grupos formados pelo método k-médias.

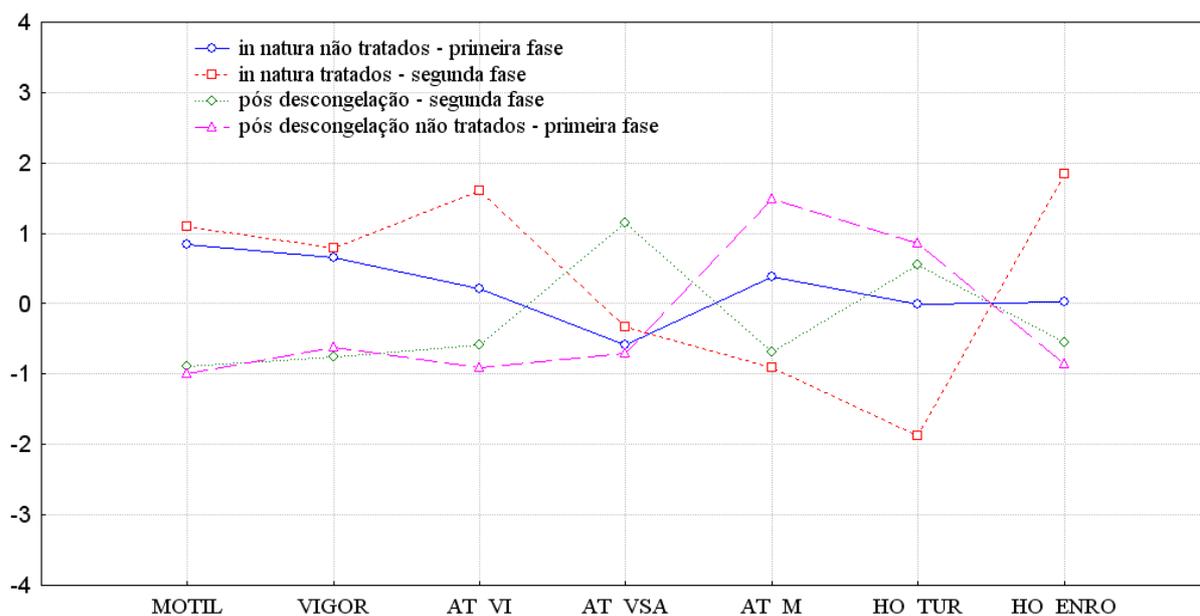
Mot: motilidade, AT (Teste Azul de Tripan) AT-VI: espermatozóide vivo íntegro, AT-VSA: espermatozóide vivo sem acrossoma, AT-M: espermatozóide morto, HO (Teste Hiposmótico) HO-TUR: espermatozóide com cauda reta, HO-ENRO: espermatozóide com cauda enrolada, MORF: morfologia.

No mesmo sentido pode-se falar do perfil das médias das características seminais dos dois grupos *in natura* (com e sem tratamento) quando comparadas com as duas médias do sêmen descongelado (com e sem tratamento), formando assim quatro grupos bem definidos (figura 3). As médias das características do segundo grupo (sêmen *in natura* – dos animais tratados)

foram superiores em relação aos outros grupos, nas características motilidade, vigor, AT-VI e HO-ENRO. As características AT-VSA, AT-M e HO-TUR, foram semelhantes ou inferiores aos outros grupos, o que indica o efeito benéfico das suplementações na qualidade dos espermatozóides.

Figura 3. Centróide contendo as médias das características seminais para os quatro grupos formados pelo método k-médias.

Mot: motilidade, AT (Teste Azul de Tripan) AT-VI: espermatozóide vivo integro, AT-VSA:



espermatozóide vivo sem acrossomo, AT-M: espermatozóide morto, HO (Teste Hiposmótico) HO-TUR: espermatozóide com cauda reta, HO-ENRO: espermatozóide com cauda enrolada, MORF: morfologia.

Na Figura 4, encontra-se a distribuição dos grupos no plano formado pelos dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) e codificados segundo os grupos obtidos pelo método k-médias. Quanto maior o valor da correlação entre uma variável e um componente principal, maior o poder discriminatório dessa variável no componente. Correlações positivas em CP1 indicam poder discriminatório de uma variável para aquelas amostras localizadas à direita do eixo horizontal e correlações negativas indicam poder discriminatório de uma variável para aquelas amostras localizadas à esquerda do eixo horizontal. Correlações positivas em CP2 indicam poder discriminatório de uma variável para aquelas amostras localizadas acima do eixo vertical e

correlações negativas indicam poder discriminatório de uma variável para aquelas amostras localizadas abaixo do eixo vertical.

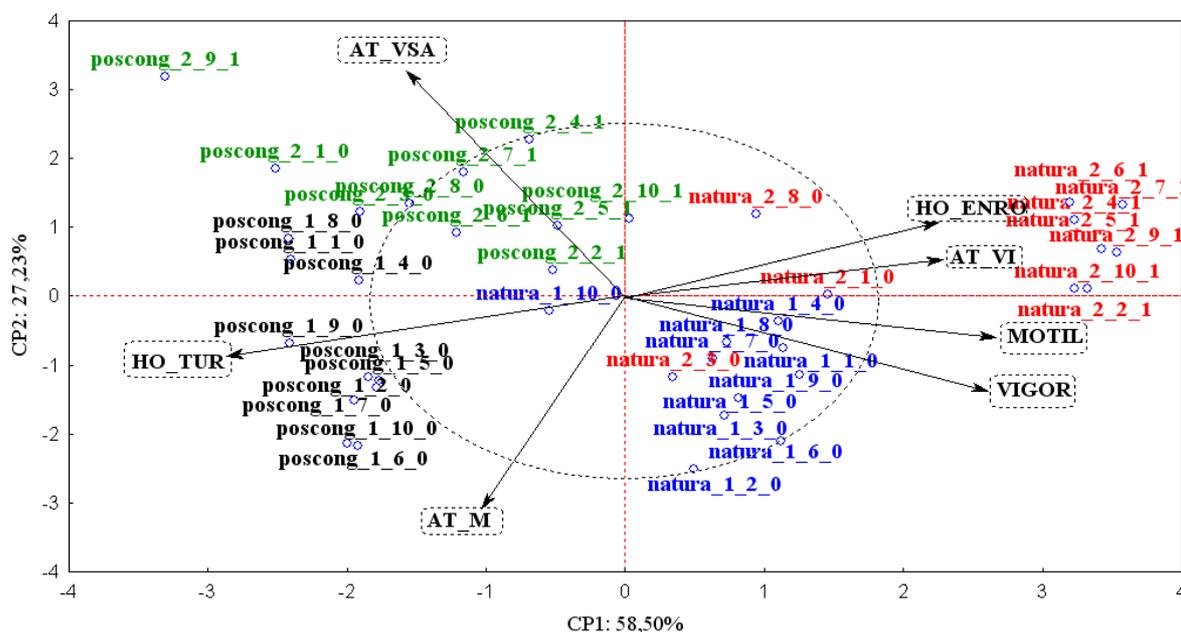


Figura 4. Bibliot contendo a distribuição dos grupos seminais de acordo com os componentes principais CP1 e CP2 e as direções das características envolvidas.

Mot: motilidade, AT (Teste Azul de Tripan) AT-VI: espermatozóide vivo integro, AT-VSA: espermatozóide vivo sem acrossomo, AT-M: espermatozóide morto, HO (Teste Hiposmótico) HO-TUR: espermatozóide túrgido, HO-ENRO: espermatozóide enrolado, MORF: morfologia, Natura (vermelho): sêmen *in natura* dos cachaços tratados, Natura (azul): sêmen *in natura* dos cachaços não tratados, Poscong (verde): sêmen descongelado dos cachaços tratados, Poscong (preto): sêmen descongelado dos cachaços não tratados.

Na Tabela 3, têm-se os valores das correlações entre as características seminais e cada componente principal.

Tabela 3. Correlação entre as características seminais antes e após a congelação do sêmen em cachacos suplementados intramuscular e não suplementados com vitaminas e minerais e os componentes principais CP1 e CP2

| Características | CP1 | CP2 |
|-----------------|-----------|-----------|
| MOTIL | 0,90294 | -0,215496 |
| VIGOR | 0,761469 | -0,363307 |
| AT_VI | 0,911515 | 0,031117 |
| AT_VSA | -0,38856 | 0,878539 |
| AT_M | -0,338262 | -0,900922 |
| HO_TUR | -0,894673 | -0,277332 |
| HO_ENRO | 0,89629 | 0,258132 |

AT (Teste Azul de Tripán) AT-VI: espermatozóide vivo íntegro, AT-VSA: espermatozóide vivo sem acrossomo, AT-M: espermatozóide morto, HO (Teste Hiposmótico) HO-TUR: espermatozóide com cauda reta, HO-ENRO: espermatozóide com cauda enrolada. Significativo pelo teste de Milks' Lambda ($p < 0,01$).

As características com maior poder discriminatório no primeiro componente principal em ordem de importância foram: AT-VI (0,912), MOTIL (0,903), HO-ENRO (0,896), HO-TUR (-0,895) e VIGOR (0,761). As características seminais com correlações positivas (AT-VI, MOTIL, HO-ENRO e VIGOR) são responsáveis pela discriminação do grupo que compõe o tratamento *in natura* tratado, uma vez que este se localiza no extremo à direita de CP1, enquanto que a característica seminal com correlação negativa (HO-TUR) é a principal responsável pela discriminação do grupo que compõe o tratamento descongelado sem tratamento, uma vez que este se localiza no extremo à esquerda de CP1.

As características com maior poder discriminatório no segundo componente principal em ordem de importância foram AT-M (0,901) e AT-VSA (0,879). A característica seminal com correlação positiva AT-M é responsável pela discriminação das amostras localizadas acima em CP2 enquanto que a característica seminal com correlação negativa AT-VSA é a responsável pela discriminação das amostras localizadas abaixo em CP2. Pode-se dizer que a característica seminal tem certa importância associada ao grupo composto pelo **tratamento descongelado com suplementação** uma vez que este se posiciona na parte superior em CP2 e também que a característica seminal AT-VSA tem certa importância associada ao grupo composto pelo **tratamento in**

natura sem suplementação uma vez que este se posiciona na parte inferior em CP2.

É importante mencionar que os resultados obtidos pelos métodos k-médias e componentes principais encontrados neste estudo sugerem que, para avaliar o sêmen *in natura* com o pós-descongelado, são necessárias somente as características MOTIL e VIGOR para a discriminação dos dois grupos enquanto que para a discriminação dos quatro grupos são necessárias as características MOTIL, VIGOR, AT-VI e AT-M.

O teste multivariado para avaliar a diferença entre os centróides dos grupos foi o teste de Wilks' Lambda que mostrou existir diferença entre os grupos ($p < 0,01$).

Os resultados da análise univariada de variância estão apresentados na tabela 4. Para avaliar possível efeito do ambiente na qualidade de sêmen devido aos 60 dias de espera a nova colheita que os animais foram submetidos, três machos foram deixados como testemunha, sem aplicação dos suplementos.

Tabela 4. Médias e F da análise de variância de características estudadas.

| Período | Fase | Trat | Turb | Mot. | Vigor | AT-VI | AT-VSA | AT-M | HO-TUR | HO-ENRO | MORF |
|--------------------------|------|------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Sêmen - <i>in natura</i> | 1 | Sem | 3,48 | 77,24 | 4,00 | 21,45 | 49,66 | 28,86 | 74,97 | 25,52 | 20,74 |
| | 2 | Sem | 3,33 ^b | 76,77 ^b | 3,61 ^b | 20,56 ^b | 60,00 ^a | 19,61 ^a | 66,34 ^a | 34,2 ^b | 27,10 ^a |
| | | Com | 4,08 ^a | 82,50 ^a | 4,06 ^a | 35,22 ^a | 56,94 ^a | 10,97 ^a | 42,1 ^b | 58,34 ^a | 12,42 ^b |
| Sêmen descongelado | 1 | Sem | . | 23,69 | 2,93 | 8,05 | 57,70 | 34,66 | 86,69 | 13,14 | . |
| | 2 | Sem | . | 22,78 ^b | 2,78 ^a | 10,1 ^b | 78,78 ^a | 11,17 ^a | 85,5 ^a | 14,5 ^b | . |
| | | Com | . | 36,11 ^a | 3,14 ^b | 16,42 ^a | 74,1 ^a | 9,81 ^a | 76,86 ^b | 23,14 ^a | . |
| Trat = sem suplementação | | | | | | | | | | | |
| F(Período) | | | . | 538,4 [*] | 82,8 [*] | 27,48 [*] | 12,15 [*] | 0,19 | 57,31 [*] | 63,78 [*] | . |
| F(fase) | | | 0,60 | 0,10 | 6,73 | 0,06 | 16,67 [*] | 29,41 [*] | 5,79 | 6,23 | 1,92 |
| F(Per x fase) | | | . | 0,01 | 1,27 | 0,40 | 1,96 | 5,57 | 3,33 | 3,3 | . |
| Trat = com suplementação | | | | | | | | | | | |
| F/Per (fase 2) | | | . | 178,44 [*] | 18,57 [*] | 29,41 [*] | 13,16 [*] | 0,1 | 101,62 [*] | 108,56 [*] | . |

Mot: motilidade, AT (Teste Azul de Tripan) AT-VI: espermatozóide vivo integro, AT-VSA: espermatozóide vivo sem acrosso, AT-M: espermatozóide morto, HO (Teste Hiposmótico) HO-TUR: espermatozóide com cauda reta, HO-ENRO: espermatozóide com cauda enrolada, MORF: morfologia. Fase 1: avaliação do sêmen *in natura* e descongelado dos 10 cachacos antes da suplementação. Fase 2: avaliação do sêmen *in natura* e descongelado dos 3 cachacos testemunhas e dos 7 cachacos suplementados. Letras diferentes entre colunas e * significam que há diferença significativa ($p < 0,05$).

A comparação dos resultados de qualidade de sêmen *in natura* das coletas dos 10 machos na primeira fase do experimento e dos três machos na testemunhas na segunda fase do experimento (figura 1) mostra que para os **parâmetros de turbilhonamento** (3,48; 3,33), **motilidade** (77,24%; 76,77%), **vigor** (4,00; 3,61), **número de espermatozoides vivos íntegros** (21,45%; 20,56%), **túrgidos** (74,97%; 66,34%) **com cauda enrolada** (25,52%; 34,2%) e **Morfologia** (20,74%; 27,10%) não houve efeito de ambiente no período de adaptação, pois a diferenças entre estes resultados não apresentaram significância estatística segundo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para os parâmetros de **espermatozoides vivos sem acrossoma** (49,66%; 60,00%) e **mortos** (28,86%; 19,61%), no entanto, as diferenças apresentadas foram significativamente diferentes, supondo possível efeito de ambiente, sendo que antes dos 60 dias de adaptação as amostras apresentavam mais espermatozoides mortos e menos vivos sem acrossoma.

Antes da suplementação, o sêmen *in natura* dos machos apresentou melhores resultados quanto aos **parâmetros de motilidade, vigor, número de espermatozoides vivos, vivos sem acrossoma e túrgidos e com cauda enrolada** quando comparado com o mesmo sêmen após a descongelação ($p < 0,05$). Estas diferenças eram esperadas, uma vez que os espermatozoides suínos sofrem inúmeros danos devido ao processo de congelação. O parâmetro de número de espermatozoides mortos não apresentou diferença estatística. O aumento da **porcentagem de espermatozoides vivos sem acrossoma e túrgidos** no teste HO após a descongelação sugerem que o processamento proporcionou aumento dos danos de membrana e acrossoma, porém não afetou de forma direta a mortalidade dos espermatozoides. O mesmo pode ser dito em relação à comparação dos resultados de sêmen *in natura* e descongelado dos machos que foram suplementados.

Em relação ao sêmen *in natura*, as suplementações com minerais e vitaminas se mostrou vantajosa. Os resultados de turbilhonamento, motilidade, vigor, túrgidos, com cauda enrolada e morfologia foram melhores para o sêmen dos machos que receberam as suplementações ($p < 0,05$). Os parâmetros de vivos sem acrossoma e mortos não apresentaram diferenças estatísticas, embora apresentassem tendência de diminuição para o sêmen dos machos que foram suplementados.

A comparação dos resultados de qualidade de sêmen descongelado das coletas dos 10 machos na primeira fase do experimento e dos três machos testemunhas na segunda fase do experimento mostra que para os **parâmetros de motilidade** (23,69%; 22,78%), **vigor** (2,93; 2,78), **número de espermatozoides vivos íntegros** (8,05%; 10,05%), **túrgidos** (86,69%; 85,5%), **com cauda enrolada** (13,14%; 14,5%) não houve efeito de ambiente no período após os 60 dias, pois as diferenças entre estes resultados não apresentaram significância estatística, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para os parâmetros de **espermatozoides vivos sem acrossoma** (57,70%; 78,78%) **e mortos** (34,66; 11,17), no entanto, as diferenças apresentadas foram significativas, supondo possível efeito de ambiente, sendo que antes dos 60 dias as amostras apresentavam mais espermatozoides vivos sem acrossoma e menos mortos.

Para o sêmen descongelado, as suplementações com minerais e vitaminas também se mostrou vantajosa, melhorando significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros de motilidade, vivos com acrossoma íntegro, túrgido e com cauda enrolada. Os resultados de vigor, vivos sem acrossoma e mortos não apresentaram diferença ($p < 0,05$).

Tanto para o sêmen *in natura* quanto após a descongelação, o aumento da porcentagem de espermatozoides vivos íntegros sugere que as suplementações podem ter auxiliado na proteção contra danos oxidativos da membrana.

6. DISCUSSÃO

Os dois procedimentos estatísticos utilizados (Análises de Variância Anova e Multivariada) mostram os mesmos resultados em relação aos dados obtidos no experimento.

A estatística multivariada é caracterizada como exploratória, e visa compreender a estrutura dos grupos contida nos dados do experimento. A metodologia utilizada na análise de agrupamento por k-médias envolve método matemático simples enquanto que a análise de componentes principais já possui uma matemática mais sofisticada. Elas não devem ser analisadas independentemente, mas uma como complemento da outra. Os resultados, quando concordantes, validam as metodologias e garantem que esses resultados são características dos dados e não dos procedimentos matemáticos.

A suplementação oral de vitaminas e minerais em cachacos pode encontrar barreiras fisiológicas para sua ação devido a: 1) a presença de micotoxinas; interação entre minerais e vitaminas; 2) estresse térmico; 3) armazenamento inadequado de ingredientes que compõe a dieta, como alta temperatura e umidade, presença de metais pesados na dieta; 4) doenças (ESTIENE, 2005). Por isso, os resultados observados nos trabalhos nem sempre são concordantes. A suplementação injetável oferece garantia de que os minerais e vitaminas serão absorvidos e utilizados para os fins a que se destinam.

Por falta de informações sobre as necessidades nutricionais dos cachacos (AUDET, et al., 2004; MULLAN, et al., 2006) a dieta utilizada no experimento poderia não estar suprindo as necessidades para a produção de espermatozoides com melhor criotolerância, justificando os efeitos positivos da suplementação injetável na maioria das características.

Os resultados da coleta dos dez cachacos antes dos 60 dias e dos 3 machos testemunhas após os 60 dias foi comparado para avaliar o efeito do ambiente sobre as características seminais. Não houve diferença estatística nos parâmetros de turbilhonamento, motilidade, vigor, número de espermatozoides vivos íntegros, túrgidos e com cauda enrolada, evidenciando que o ambiente não influenciou na qualidade espermática. LARSEY & CRABO

(1980) não encontraram evidências claras do efeito do clima sobre a qualidade de sêmen suíno.

6.1. Sêmen *in natura* vs sêmen congelado

Antes da suplementação, o sêmen *in natura*, quando comparado com o mesmo sêmen após a descongelação, apresentou melhores resultados quanto ao **turbilhonamento, motilidade, vigor, número de espermatozóides vivos, vivos sem acrossoma, retos e com cauda enrolada** ($p < 0,05$) (Tabela 4). Estas diferenças eram esperadas, uma vez que os espermatozóides descongelados foram submetidos a choque térmico e estresse osmótico (WATSON, 1981, 2000; WATSON & DUNCAN, 1988; ROBERTSON & WATSON, 1986; ROBERTSON, 1988; BAILEY et al, 2000, 2008; NOILES et al., 1995, 2003; SELLES, 2001) que danificaram a integridade de membrana espermática (Figura 1) (CUMMINS *et al.*, 1994; FUNDERBURKER & SHIPP, 2007; AGARWAL et al., 1994; STUBBS & SMITH, 1984; CEROLINI et al., 2000; BROUWERS, J.F, et al., 2005).

O número de espermatozóides mortos no sêmen *in natura* e no processamento de criopreservação (Figura1) não apresentou diferença estatística devido: a) ao procedimento da congelação, que envolveu a crioproteção e os limites da curva de congelação, permitir a troca osmótica, evitando a formação de cristais de gelo (WATSON, 2000); b) a padronização das condições de manejo e da genética dos cachacos que pode ter permitido o mesmo padrão de criotolerância dos espermatozóides (Figura 3). AUDET, et al. (2009) supõe haver interações entre genótipos em relação à resposta a suplementação vitamínica via oral. SELLES (2001) cita que um fator relevante na criopreservação de sêmen é a variabilidade que existe entre raças. ALMLID e HOFMO (1999) encontraram maior viabilidade do sêmen em animais da raça Landrace quando comparados com a raça Duroc.

O aumento da porcentagem de **espermatozóides vivos sem acrossoma** (coloração com Giemsa/ Azul de Tripan) **e retos** (teste HO) nos espermatozóides descongelados sugerem que o processo da congelação proporcionou aumento dos danos de membrana e acrossoma, porém não afetou de forma direta a mortalidade dos espermatozóides. O processo de

criocapacitação é o principal responsável pela perda do acrossomo (WATSON, 2000; BAILEY, et al., 2003), o que pode explicar o aumento da quantidade de vivos reagidos encontrados após a congelação. JEONG et al. (2009), comparando sêmen *in natura* e congelado de cachacos pela coloração PSA-FITC e PI observaram que no sêmen *in natura*, a maioria dos espermatozóides apresentavam acrossoma intacto, enquanto no sêmen congelado, os espermatozóides exibiam acrossomo parcialmente danificado ou totalmente ausente.

6.2. Sêmen *in natura* antes e depois da suplementação

Para o sêmen *in natura*, a suplementação intramuscular com minerais e vitaminas mostrou-se vantajosa apesar da porcentagem de espermatozóides vivos sem acrossoma e espermatozóides mortos apresentaram apenas uma tendência de diminuição para o sêmen dos machos após a suplementação.

Os parâmetros turbilhonamento, motilidade, vigor, espermatozóides com cauda reta e com cauda enrolada, bem como, a morfologia foram melhores para o sêmen dos machos que receberam a suplementação ($p < 0,05$) (Figura 3; Tabela 4). MARIN-GUZMAN (1997) também observou melhora de motilidade espermática com a suplementação oral cachacos com Se (0,5 ppm). A maior motilidade pode ser devido a fato de o selênio estar envolvido diretamente na movimentação flagelar do gameta, uma vez que BROWN & BURK (1973) e CALVIN (1979) observaram aumento da concentração de selênio na peça intermediária de espermatozóides de ratos previamente suplementados com esse mineral via injetável. É na peça intermediária que se encontram as mitocôndrias responsáveis pela geração de energia (ATP) no processo de movimentação flagelar. MARIN-GUZMAN et al. (2000) avaliando quatro tipos de dietas, suplementadas com selênio (0 e 0,5 ppm) ou com vitamina E (0 e 220UI/kg de dieta) observaram redução na concentração de ATP na dieta não suplementada com selênio. Este efeito pode diminuir a motilidade espermática e reduzir as taxas de fecundação. A vitamina E não apresentou efeito neste parâmetro (MARIN-GUZMAN et al., 2000).

ESTIENE (2009), também observou aumento da porcentagem de espermatozoides com motilidade quando suplementou via oral 10 cachacos com Se (0,3 ppm).

Associado a melhora na motilidade, o aumento da porcentagem de espermatozoides com morfologia normal no grupo de cachacos suplementados pode ser devido à vitamina E. MARIN-GUZMAN (1997) pela suplementação oral de machos com vitamina E (220 UI/kg de dieta) encontraram melhora de motilidade e morfologia dos espermatozoides, diminuindo principalmente a incidência de gotas citoplasmáticas, embora os resultados desta dieta fossem inferiores aos resultados da dieta com suplementação de selênio.

6.3. Sêmen descongelado antes e após o tratamento de suplementação dos cachacos.

Para o sêmen descongelado, as suplementações com minerais e vitaminas também se mostrou vantajosa, melhorando significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros de motilidade, espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, com cauda reta e enrolada. Os resultados de vigor, vivos sem acrossoma e mortos não apresentaram diferença estatística. A maioria dos trabalhos sobre vitaminas e minerais na congelação de sêmen de suínos se restringem a adição de vitaminas no diluidor. PEÑA et al. (2003), usou análogo de vitamina E (100 μMol e 200 μMol) adicionado ao diluente de sêmen suíno e submeteram ao processo de congelação. Os autores dividiram o ejaculado em duas diferentes frações, a fração rica (I) e a pobre em espermatozoides (II) e avaliaram a motilidade pelo sistema CASA e potencial da membrana da mitocôndria usando citômetro de fluxo após coloração. A suplementação do antioxidante proporcionou melhores valores de motilidade no sêmen descongelado, tanto pela análise subjetiva quanto pelo sistema CASA. O efeito foi mais pronunciado na fração pobre (II). Na fração rica (I), somente a concentração mais alta do antioxidante mostrou diferença estatística no parâmetro motilidade. O número de espermatozoides que apresentaram alto potencial de membrana após a descongelação foi pequeno (de 0,31 a 0,78%) em relação à análise do sêmen *in natura*. A adição do antioxidante proporcionou aumento significativo de espermatozoides exibindo alta atividade

mitocondrial. Assim como a membrana plasmática a mitocôndria é uma estrutura do espermatozóide sensível ao processo de congelação e descongelação (CUMMINS et al., 1994). BREININGER, et al. (2005) também encontrou benefícios da adição de vitamina E no diluente de congelação do sêmen suíno, para prevenir estresse oxidativo. BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al. (1995) sugere que a vitamina E atua com antioxidante no sêmen de suínos.

JEONG et al. (2009) também encontraram benefício na motilidade e viabilidade de amostras de sêmen suíno quando adicionaram vitamina E no diluente de criopreservação na quantidade de 100 e 200 μMol , em comparação com sêmen sem adição ou adição de 400, 600 ou 800 μMol da vitamina.

Tanto para o sêmen *in natura* quanto após a descongelação, o aumento da porcentagem de espermatozoides vivos íntegros sugere que a suplementação auxiliou na proteção contra os danos de membrana e oxidativos.

MARIN-GUZMAN et al. (1997) encontraram aumento da concentração da enzima glutathiona peroxidasa no plasma seminal de suínos quando estes foram suplementados com Se. CEROLINI et al. (2001) demonstraram que amostras de sêmen com alta viabilidade após a descongelação apresentavam alta atividade da enzima Glutathiona Peroxidase e Superóxido Dismutase. Esta última enzima é dependente de Zn e Cu (LEWIS et al., 2000). Estes minerais foram acrescentados na suplementação dos machos do presente experimento, o que pode explicar a maior viabilidade das amostras de sêmen após descongelação quando os machos foram suplementados.

7. CONCLUSÕES

7.1. As suplementações vitamínicas e minerais intramuscular melhoraram as características seminais (motilidade, vigor, morfologia espermática e integridade acrossomal e da membrana) do sêmen *in natura* dos cachacos;

7.2. As suplementações vitamínicas e minerais intramuscular melhoraram as características seminais (motilidade, vigor, integridade acrossomal e da membrana) do sêmen descongelado dos cachacos;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A., IKEMOTO, I., LUOGHLIN, K.R. Relationship of sperm parameter with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **J. Urol.**, v.152, p.107-10, 1994.

AITKEN R.J.; CLARKSON J.S.; FISHEL S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biol. Reprod.**, v.40, p.183-7, 1989.

AITKEN R.J.; HARKISS D.; BUCKINGHAM D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v.35, p.302-15, 1993.

AITKEN, R.J., KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p.497-06, 2001.

ANTUNES R.C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1. p.60-3, 2007.

AUDET I, LAFOREST J.P, MARTINEAU G. P AND MATTE J. J. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.626-33, 2004.

AUDET, I.; BERUBÉ, N.; BAILEY, J.L.; LAFOREST, J.P.; QUESNEL, H.; MATTE, J.J.. Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on hormonal profile during ejaculation in the boar. **Theriogenology**, v.71, p.334-41, 2009.

BAILE, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

BAILE, J.L., BUHR, M.M. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. **Can. J. Anim. Sci.**, v.74, p.45-51, 1994.

BAILEY, J.L., LESSARD, C., JACQUES, J., BRÈQUE, C., DOBRINSKI, I., ZENG, W., GALANTINO-HOMER, H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v.70, p.1251-9, 2008.

BAILEY, J.L., MORRIER, A., CORMIER, N. Semen cryopreservation in farm species: an update. **Can. J. Anim.**, v.83, p.393-01, 2003.

BERTELSMANN, H., SIEMEN, H., BEHNE, D., KYRIAKOPOULOS, A. Is the distribution of selenium and zinc in the sublocation of spermatozoa regulated? **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1095, p.204-8, 2007.

BILODEUA, J.F., BLANCHETTE, S., CORMIER, N., SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-12, 2002.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v.68, p.147-55, 2007.

BONET S, BRIZ M, PINART E, SANCHO S, GARCÍA-GIL N y BADIA E. Morfología espermática en porcino. **Institut d'Estudis Catalans**, 2000.

BOOTMAN, M.P.; COOLLINS, T.J.; PEPPIATT, C.M.; PROTHERO, L.S.; MACKENZIE, L.; SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEYS, S.C.; SEO, J.T.; BERRIDGE, M.J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling: an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.2, p.3-7, 2001.

BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I. **Suinocultura em ação**: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada.

BROWN, D.G., BURK, R.F. Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a torula yeast diet. **J. Nutr**, v.102, p.102-8, 1973.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., A.B. SLEBODZINSKI, B. PIETRAS, G. WIECZOREK. Antioxidant effect of vitamin E and glutathio-nine on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biol. Trace Element Res.**, v.47, p.69-74, 1995.

BUHR, M.M., CANVIN, A.T., BAILEY, J.L. Effects of semen cryopreservation on boar spermatozoa head membranes. **Gamete Res.**, v.23, p.441-9, 1989.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. **Acc. Chem. Res.** n.19, p.194-01, 1986.

CALVIN, H.I.; COOPER, G.W. A specific selenopolypeptide associated with the outer membrane of rat sperm mitochondria. In: **Facett, D.W.; Bedford, J.M. The Spermatozoon**, p.135-40, 1979.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; SAID, L.; SAAD, A.; GALERAUD D.I. RNA dynamics of fertile spermatozoa. **Biochemical Society Transactions**, v.35, n.3, p.634-5, 2007.

CARVAJAL, G., CUELLO, C., RUIZ, M., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., ROCA, J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **J. Androl**, v.25, n.3, p.389-96, 2004.

CEROLINI, S.; MALDJAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R.. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar sêmen during liquid storage. **Anim. Reprod.**, v.58, n.1-2, p.99-111, 2000.

CEROLINI, S.; MALDJAN, A; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M.. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, n.121, p.395-1, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C.. Production of reative oxyen species by sperm undergoing cooling, freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, v.59, p.451-8, 2001.

CLOSE, W.H., ROBERTS, F.G. in: **Recent Developments in Pig Nutrition 2**. D.J.A. Cole, W. Haresinh, and P.C. Garnsworthy, ed. Nottingham University Press, Nottingham, U.K., p.347-68, 1993.

CLOSE, W.H.. Trace mineral nutrition in pigs revisited: meeting production and environmental objectives. **Rec. Adv. Anim. Nutr**, n.14, p.133-42, 2003.

COOPER, D.R., O.R. KING, AND M.P. CARPENTER. Effect of vitamin E deficiency on serum concentrations of follicle-stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration. **Endocrinology**, v.120, p.83-90, 1987.

CROMWELL G.L, BAKER D.H, EWAN R.C, KORNEGAY E.T, LEWIS A.J, PETTIGREW J.E, STEELE N.C, THACKER P.A. **Nutrient Requirements of swine**: 10th revised Edition. 1998.

CUMMINS, J.M. Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. **Theriogenology**., v.55, p.1381-99, 2001.

CUMMINS, J.M., JEQUIER, A.M., KAN, R. Molecular biology of the human male in infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Mol. Reprod. Dev**, v.37, n.345-62, 1994.

DARSZON, A., LABARCA, P., ISHIGAKI, T., ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Review, S.I.**, v.79, n.2, p.481-10, 1999.

DIEBER-ROTHENEDER, M., PUHL, H., WAEG, G., STRIEGL, G., ESTERBAUER, H. Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. **J. Lipid Res.**, v.32, p.1325-32, 1991.

DONI, M.G., G.L. AVVENT, L. BONADIMAN, AND G. BONACCORSO. Glutathione peroxidase, selenium and prostaglandin synthesis in platelets. **Amer. J. Physiol.**, v.240, p.800-3, 1981.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Arch Zootec**, v.51, n.193-4, p. 39-52, 2002.

EL-DARAWANY, A.A., Improving semen quality of heat stressed rams in Egypt. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.69, n.12, p.1020-23, 1990.

ERASMUS, E.L., OETTLE, E.E., FRANKEN, D.R., KRUGER, T.F., OEHNINGER, S.C. Analysis of association between reactive oxygen species and semen quality. **J. Androl.** (abstract), v.18, p.3, 1992.

ERIKSON, M.C. Chemistry and function of phospholipids. In: Akoh CC, Min DB, Editors. **Food lipids, chemistry, nutrition and biochemistry**. New York: Marcel Dekker Inc; p.41, 1998.

ERIKSSON, B.M., RODREIGUES-MARTINES, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws. **Animal Reproduction Sci**, v.63, p.205-20, 2000.

ESTEINE, M.J., HARPER, A.F., TIDEWATER, AREC., KNIGHT J.K. Enhanced Fertility in Boars Fed Diets Supplemented with Sel-Plex® selenium. **Technical Articles–PigIndustry**, 2009.

ESTIENNE, M.J. Maximizing boar productivity with optimum trace mineral supplementation. **Symposium "Redefining Trace Mineral Nutrition: Supplementation strategies for modern diets and genetics"** 2005.

EVANS, J.P., FLORMAN, H.M. The state of the union: the cell biology of fertilization. **Nat Cell Biol.**, v.4, p.57-63, 2002.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org>, 2002.

FLORMAN, H.M., ARNOULT, C., KAZAM, I.G., LI, C., O'TOOLE, C.M.B. Calcium channels of mammalian sperm: properties and role in fertilization. In: Gagnon C, editor. **The male gamete: from basic science to clinical applications.**, p.187-93, 1999.

FRANCHINI, A.; BERGONZONI, M.L.; MELOTTI, C.; MINELLI, G.. The effects of dietary supplementation with high doses of Vitamin E and C on the quality traits of chicken semen. **Arch. Geflugelk.**, v.65, p.76-81, 2001.

FUNDERBURKE D.; SHIPP, T. Sperm, reactive oxygen species (ROS) and anti-oxidants, 2007.

FURLAN, L.R., FERRAZ, A.L.J., BORTOLOSSI, J.C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.36, p.331-41, 2007.

GALERAUD-DENNIS, I.; LAMBARD, S.; CARREAU, S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. **Asian J. Androl.**, v.9, n.5, p.587-92, 2007.

GAO, G.Y., ASHWORTH, E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P., CRITSER, J.K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. **Biol. Reprod.**, v.49, p.112-23, 1993.

GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; VERNON, G.P.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, v.63, p.283-99, 2005.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; Taylor, P. As Bases Farmacológicas da Terapeutica, 8a. Ed., p.1232, 1991.

GOLDMAN, E.E., ELLINGTON, J.E., FOOTE, R.H. Reaction of fresh and frozen bull spermatozoa incubated with fresh and frozen bovine oviduct epithelial cells. **Reprod Nutr Dev.**, v.38, p.281-8, 1998.

GRAHAM EF, RAJAMANNAN AHJ, SCHMEHL MKL, MAKI-LAURILA M, R.E. B. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar spermatozoa. **AI Digest**; v.19, p.12–4, 1971.

GREEN, C.E., WATSON, P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v.122, p.889-98, 2001.

HAIR, J.F., ANDERSON, R.E., TATHAM, R.L., BLACK, W. **Análise Multivariada de dados**. Porto Alegre. RS, 5ª ed., 2005.

HALL, S.M., EVANS, J., HAWORTH, S.G. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.9, p.106-14, 1993.

HANCOCK, R.E.W., and BENZ R. Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.860, p.699-7, 1986.

HANSEN, J.C. AND Y. DEGUCHI. Selenium and fertility in animals and man- a review. **Acta. Vet. Scand.**, v.37, p.19-30, 1996.

HENMAN, D. Organic mineral supplements in pig nutrition: performance and meat quality, reproduction and environmental responses. In: **Biotechnology in the feed industry**, Nottingham, UK. Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium, Nottingham, United Kingdom., p.297-04, 2001.

HOLT, W.V., MEDRANO, A., THURSTON, L.M., WATSON, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v.63, p.370-82, 2005.

HOPE, W.C., C. DALTON, L.J. MACHLIN, R.J. FILIPSKI, AND F.M. VANE. Influence of dietary vitamin E on prostaglandin biosynthesis in rat blood. *Prostaglandins* 10: 557-571. 1975.
http://en.engormix.com/MApigindustry/genetic/articles/enhanced-fertility-boars-fed_1231.htm

JACYNO, E., M. KAWECKA, M. KAMYCZEK, A. KOLODZIEJ, J. OWSIANNY, AND B. DELIKATOR. Influence of inorganic SE + vitamin E and organic SE + vitamin E on reproductive performance of young boars. **Agric. Food. Sci. Finland.**, v.11, p.175-84, 2002.

JACYNO, E., M. KAWECKA, M. KAMYCZEK, A. KOLODZIEJ, J. OWSIANNY,; B. DELIKATOR. Influence of inorganic SE + vitamin E and organic SE + vitamin

E on reproductive performance of young boars. **Agric. Food. Sci.** Finland., v.11, p.175-84, 2002.

JEONG, Y.J., KIM, M.K., SONG, H.J., OCK, S.A., KUMAR, M., BALASUBRAMANIA, S., RHO, G.J. Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Criobiology**, v.58, p.181-9, 2009.

JOHN KOPINSKI, DPI&F. Minerals for pigs. www.dpi.qld.gov.au/pigs/, **DPI&F's national Pig Technotes**, 2005.

JOHNSON, L.A. Fertility result using frozen boar spermatozoa. In: Jhonson,LA, Larsson, K (eds),Deep Freezing Boar Semen. **Proc 1st Int Conf Deep Freezing of Boar Semen**. SLU, Uppsala, p.199-23, 1985.

JONGBLOED, A.W. AND P.A. KEMME. Apparent digestible phosphorus in the feeding of pigs in relation to availability, requirement and environment. 1. Digestible phosphorus in feedstuffs from plant and animal origin. **Neth. J. Agric. Sci.**, v.38, p.567-75, 1990.

KATZER, L.H., BERNARDI M.L., BORTOLOZZO F.P., WENTZ. Viabilidade de semen suíno armazenado a 5°C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.138-44, 2005.

KEMP, B., SOEDE, N.M. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.52, p.79-89, 1997.

KOŁODZIEJ, A. AND E. JACYNO. Effect of selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. **Archiv fur Tierzucht**, v.48, p.68-75, 2005.

KOŁODZIEJ, A., JACYNO, E. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boards. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.7, n.1, 2004.

KOPINSK, J. Minerals for pigs. www.dpi.qld.gov.au/pigs/, DPI&F's national Pig Technotes, 2005.

KOVACS, A., FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic and Histochemistry**, London, v.67, n.3, p.119-24, 1992.

KRAUSE, B. Untersuchungen am bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen bedeutung der befunde. **These, Hannover, Tierärztliche Hochschule**, 1996.

LANGAIS, J., ROBERTS, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Res.**, v.12, p.183-24, 1985.

LASSO, J.L., NOILES, E.E., ALVAREZ, J.C., STOREY, B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **J. Androl.**, v.15, p.255-65, 1994.

LECHNIAK, D., KEDZIERSKI, A., STANISLAWSKI, D. The use of HOS tesr to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated *in vitro*. **Reprod. Dom. Anim.**, v.37, p.379-80, 2002.

LEWIS, A.J., LEE SOUTHERN L. **Swine Nutrition, second edition**. Hardcover, 2000.

LIAO, C.W.; Chyr, S.C.; Shen, T.F.. The effect of dietary zinc content on reproductive performance of boars. Proc. **Of the Third EAAP Animal Science Congress**, v.2, p.613-15, 1985.

LIMA, F.P., MURGAS, L.D.S., SILVIO LUIZ DE OLIVEIRA, S.L., LIMA, D., ALVARENGA, A.L.N., FIALHO, E.T. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática e atividade da aspartato amino transferase no sêmen resfriado de suíno. **Ciên. Agrotec**, v.31, n.5, p.1506-11, 2006.

LIN, Y., KAN, F.W.K. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. **Biol Reprod.**, v.55, p.1133-46, 1996.

LIPTRAP, D.O.; MILLER, E.R.; ULLREY, D.E.; WHITENACK, D.L.; SCHOEPKE, B.L.; LUECKE, R.W.. Sex influence on the zinc requirement of developing swine. **Journal Amin. Sci**, n.30, p.736-41, 1970.

LIU, C.H., Y.M. CHEN, J.Z. ZHANG, M.Y. HUANG, Q. SU, Z.H. LU, R.X. YIN, G.Z. SHAO, D. FEND, AND P.L. ZHENG. Preliminary studies on influences of selenium deficiency to the developments of genetical organs and spermatogenesis of infancy boars. **Acta Vet. Zootech. Sin.**, v.13, p.73-7, 1982.

LOPEZ, A.S. Congelación de semen porcino, v. 7, tema 3 1998
<http://spain.hypor.com/dbdocs//3fe19dce61ddc.pdf>.

LUCY, J.A. Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.203, p.4-11, 1972.

MAHAN, D., ZAWADZKI, J., GUERRERO, R. Mineral metabolism and boar fertility: observation from Latin America to Europe. In: **Biotechnology in the feed industry, Proceeding of Alltech's 18th Annual Symposium** (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, UK, p.411-18, 2002.

MAHAN, D.C.; PARRET, N.A.. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. **J. Anim. Sci.** n.74, p.2967-74, 1996.

MARIN-GUZMAN J., D. C. MAHAN AND J. L. PATE. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. **J Anim Sci.**, v,78, p.1537-43, 2000b.

MARIN-GUZMAN J., MAHAN D.C., AND WHITMOYER R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar

spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. **J. Anim. Sci.**, v,78, p.1544–50, 2000a.

MARIN-GUZMAN, J.; D.C. MAHAN, Y.K. CHUNG, J.L. PATE, AND W.F. POPE. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar Performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.2994-03, 1997.

MASON, K.E., BURNS, W.A., SMITH, J.C Jr. Testicular damage associated with zinc deficiency in pre- and postpubertal rats: response to zinc repletion. **The Journal of Nutrition**, v.112, n.5, p.1019-28, 1982.

MASON, K.E. Minimal requirements of male and female rats for vitamin E. **Am. J. Physiol.**, v.131, p.268, 1940.

MASON, K.E. Testicular degeneration in albino rats fed a Purified food ration. **J. Exp. Zool.**, v.45, p.159-229, 1926.

MASON, K.E., S.I. Maner. Reversible testis damage in the vitamin E deficient hamster. **Anat. Rec.**, v.127, p.329 (Abstr.), 1957.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)**, v.16, p.125-42, 1984.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v.14, p.251-72, 1977.

MAZUR, P., LEIBO, S.P., CHU, E.H. A two-factor hypothesis if freezing in jury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental cell Research**, v.71, p.345-55, 1972.

McDOWELL, L.R. Vitamins in animal nutrition. **Academic Press**, San Diego, CA, 1989.

MIAH, A.G., TAREQ, K.M.A., HAMANO, K., KOHSAKA, T., TSUJII, H. Effect of relaxin on acrosome reaction and utilization of glucose in boar spermatozoa. **Journal of reproduction and Development**, v.52, n.6, p.773-9, 2006.

MULLAN, B., HERNANDEZ, A., D'SOUZA, D., PLUSKE, J. Modern pig nutrition for performance: minerals, metabolism and the environment. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. **Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium**, Lexington, Kentucky, USA, p.22-5, 2006.

MURGAS, L.D.S. Desempenho reprodutivo de varroes híbridos alimentados com rações suplementadas com óleo de soja como fonte de ácidos graxos. Tese (Doutorado) – **Universidade Federal de Lavras**, Lavras, 1999.

NEILL, D.J.. **Physiology of reproduction**, v.1, 3^a. Edição, 2006.

NISHIMURA, K., MORII, H. Effects of glutathione on the motility of frozenthawed boar spermatozoa. **Anim Sci Technol (Jpn)**, v.64, p.433-9, 1993.

NOILES, E.E., BAILEY, J., STORY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0° C. **Cryobiology**, v.32, p.220-38, 1995.

NRC Nutrient requirements of swine (10th Revised Ed) **National Academy Press, Washington, DC.**, 1998.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L.D.S.; MESQUITA, S.P. Inseminação Artificial em Suínos. **Universidade Federal de Lavras (UFLA)**. Boletim Técnico do Governo do Brasil., n.79, p.1-16, 2008.

OSTERMEIER, G.C.; GOODRICH, R.J.; MOLDENHAUER, J.S.; DIAMOND, P.M; KRAWETZ, S.A. A suite of novel human spermatozoa RNAs. **Journal of Andrology**. v.26, n.1, p.70-4, 2005.

PARRISH, J.J., FOOTE, R.H. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. **Biol Reprod.**, v.35, p.253-7, 1986.

PEÑA, F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., MARTINEZ RODREIGUEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different Fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.85-98, 2003.

PENNY, P.C.; NOBLE, R.C.; MILDJIAN, A.; CEROLINI, S. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. **Pig Inform.**, v.25, p.119-26, 2000.

PÉREZ, C. Técnicas estadísticas con SPSS. Madrid: **Pearson Educación**, p.438, 2001.

PETTITT, M.J., BUHR, M.M. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. **J. Androl.**, v.19, p.736-46, 1998.

POULOS, A., DARIN-BEENETT, A., WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes in mammalian spermatozoa. **Comparatives Biochemistry and Physiology**, v.46, p.541-9, 1973.

PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A., SCHULMAN, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J Anim. Sci**, v.35, p.580-4. 1972.

REIS, E. Estatística multivariada aplicada. Lisboa: **Edições Sílabo**, p.343, 2001.

ROBERTSON, L., WATSON, P.F., PLUMMER, J.M. Prior incubation reduce calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. **Croy-lett.**, v.9, p.286-93, 1988.

ROOKE, J.A.; SHAO C.C.; SPEAKE BK. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction.**, v.121, p.315-22, 2001.

ROPA, L. Perspectivas da produção mundial de carnes, 2006 a 2030. **Revista suinocultura industrial.**, n.34, p.16-27, 2006.

SALING, P.M., STOREY, B.T. Mouse gamete interaction during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. **J Cell Biol.**, v.83, p.544-55, 1979.

SARAVIA F, WALLGREN M, NAGY S, JOHANNISSON A, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, v.63, n.5, p.1320-33, 2005.

SATORRE, M.M., BREININGER, E., BECONI, M.T., BEORLEGUI, N.B. Protein tyrosine phosphorylation under capacitating condition in porcine fresh spermatozoa and sperm cryopreserved with and without alpha tocoferol. **Andrology**, v.41, p.184-92, 2009.

SCHEID, I. R. Manual de inseminação artificial de suínos: procedimentos e métodos de laboratório. Concórdia: **CNPSA/Embrapa**, p.48, 1993.

SEGERSON, E.C., GETZ, W.R., JOHNSON, B.H. Selenium and reproductive function in boards fed a low selenium diet. **J. Anim. Sci**, v.53, p.1360-7, 1981.

SELLÉS S. E. Estudio de diferentes factores que afectan a la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides crioconservados en la especie porcina. **Universidad de Murcia, Departamento de Biología Animal**, Cátedra de Fisiología Animal, 2001.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. **Current Conceptions**, 2a edition, 2002.

SHADAN, S., JAMES, P.S., HOWES, E.A., JONES, R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. **Biol Reprod**, v.71, p.253-65, 2004.

SHARIF N.A.; XU S.X.; WILLIAMS G.W.; CRIDER J.Y.; GRIFFIN B.W.; DEVIS T.L. Pharmacology of [3H] prostaglandin E1/[3H] prostaglandin E2 and [3H] prostaglandin F2 alpha binding to EP3 and receptor binding sites in bovine corpus luteum: characterization and correlation with functional data. **J. Pharmacol Exp Ther**. v.286, p.1094-1103, 1998.

SLAWETA, R., WASOWICZ, W., LASKOWSKA, T. Selenium content, glutathione peroxidase activity, and lipid peroxide level in fresh bull semen and

its relationship to motility of spermatozoa after freezing-thawing. **Zentralbl Veterinarmed A.**, v.35, p.455-60, 1988.

SPUNGIN, B., MARGALIT, I., BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **J.Cell Sci.**, v.108, p.2525-35, 1995.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7. **www.statsoft.com**, 2004.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochemica et Biophysica Acta.**, v.779, n.1, p.89–137, 1984.

SUAREZ, S.S.; HO, H.C.. Hyperactivation of mammalian sperm. **Cellular and Molecular Biology.**, v.49, n.3, p.351-6, 2003.

TAMULI, M.K., WATSON, P.F. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. **Vet. Rec.**, v.135, p.160-2, 1994.

THUWANUT, P., CHATDARONG, K., TECHAKUMPHU, M. AXNÉR, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Trieriogenology**, v.70, p.233-40, 2008.

TONIOLLI, R.; COMBARNOUS, Y. Adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) ao diluidor do sêmen do reprodutor: efeito sobre a motilidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.1, p.33-40, 1999.

TRAVIS, A.J., KOPF, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **J Clin Invest.**, v.110, p.731-6, 2001.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Do sperm cell age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p.321-31, 1997.

WAGNER, H.G.; THIBIER, M. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. **Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden**. Abstracts v.2, p.15-23, 2000.

WATANABE, T., OHKAWA, K., KASAI, S., EBARA, S., NAKANO, Y., WATANABE, Y. The effects of dietary vitamin B₁₂ deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. **Congenital Anomalies**, v.43, p.57-64, 2003.

WATSON, A.A. Seminal vitamin B₁₂ and sterility. **Lancet**, v.29, p.644, 1962.

WATSON, P.F. the causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.281-492, 2000.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J., Clarke, A. (Eds.), **Effects of low temperatures on biological membranes**. Academic Press, London., p.189-218, 1981.

WATSON, P.F., DUNCAN, A.E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, v.25, p.131-42, 1988.

WEGGER, I., PALLUDAN, B. Zinc metabolism in swine with special emphasis on reproduction. In trace element metabolism in man and animals. In: **Swinw Nutrition** (edited by Austin J. Lewis and L. Lee Southern – second edition). 1977.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. **Reprod Fertil Dev.**, v.5, p.639-58, 1993.

YOSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I.. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on sêmen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reprod Sci.**, n.76, p.99-111, 2003.