

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CONGELAÇÃO E EFEITO DO MEIO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN
SUÍNO NO INVERNO E VERÃO**

NINA MIGLIORANZA VELLOSO

BOTUCATU - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CONGELAÇÃO E EFEITO DO MEIO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN
SUÍNO NO INVERNO E VERÃO**

NINA MIGLIORANZA VELLOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária (Área
de Concentração: Reprodução Animal)
para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Oba
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniella Jorge
de Moura

BOTUCATU - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Velloso, Nina Miglioranza.

Congelação e efeito do meio sobre as características físico-químicas do sêmen suíno no inverno e verão / Nina Miglioranza Velloso. - Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Daniella Jorge de Moura

Capes: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Suíno – Sêmen.

Palavras-chave: Clima; Congelação; Diluentes; Sêmen; Suínos.

Nome da Autora: Nina Miglioranza Velloso

Título: CONGELAÇÃO E EFEITO DO MEIO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN SUÍNO NO INVERNO E VERÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Eunice Oba
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Anibal de Sant`Anna Moretti
Membro
Departamento de Nutrição e Produção Animal
FMVZ – USP – Pirassununga

Prof. Dr. Rubens Stahlberg
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - Betim

Data da Defesa: 05 de agosto de 2011.

Este trabalho é dedicado...

À minha mãe e melhor amiga, que sempre me incentivou, me apoiou, me deu forças e acreditou em mim.

Ao Fausto, meu noivo, que transformou a minha vida e que me dá motivos para sorrir a cada dia.

À minha filha Ana, cujo rostinho ainda não conheço, mas que já amo com todo meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus Botucatu, e ao Departamento de Reprodução Animal pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

À Prof^a Dr^a Eunice Oba, pela orientação, dedicação e participação na execução das análises, bem como em todas as etapas deste projeto.

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa e ao amigo José Antonio Dell`Aqua Junior, pelas orientações, sugestões e apoio incondicional ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Gabriel Monteiro, Natália Freitas, Priscilla Guasti, Stephane Vexenat e Luís Reis, pelo companheirismo e colaboração com as análises.

Ao Prof. Dr. Alcides de Amorim Ramos e ao colega Gustavo Araújo, pelo apoio nas análises estatísticas.

À Dra. Priscila Viau e ao Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP – São Paulo, pelas dosagens de corticosterona.

À Prof^a Dr^a Daniella Jorge Moura da Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP, pelo apoio desde o início deste trabalho.

Ao mestrando Igor e ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, pela liofilização das amostras fecais.

Ao técnico Carlos Roberto, do Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, pelas orientações referentes às dosagens de frutose e ácido cítrico no sêmen.

Aos colegas de Pós-Graduação, pelo convívio e colaboração.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, do Departamento de Reprodução Animal e do setor de Informática, pelas informações, apoio e serviços prestados.

Aos meus sogros, Maria do Carmo e Walter, que me acolheram com tanto carinho nos momentos finais do meu doutorado.

Ao meu querido Markus, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas deste trabalho e, principalmente, pela ajuda fundamental nos momentos finais.

Ao Buda, pela companhia constante e pelo amor incondicional e recíproco.

Aos proprietários Vanderlei e Mateus Bressiani e aos funcionários da Granja Agropecuária Bressiani, especialmente ao gerente José Geraldo Faria, que permitiram a colheita de amostras para a realização do experimento.

Aos animais do experimento, pela participação direta neste trabalho.

*De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando...
a certeza de que é preciso continuar...
a certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...*

*Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro.*

(Fernando Sabino)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) do sêmen suíno no momento pré-centrifugação entre os meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI[®] (BSUI), no inverno e verão.....**43**
- Tabela 2:** Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os diluentes Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI[®] (BSUI) no momento pré-centrifugação no inverno.....**44**
- Tabela 3:** Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os diluentes Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI[®] (BSUI) no momento pré-centrifugação no verão.....**44**
- Tabela 4:** Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP do diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) entre inverno e verão no momento pré-centrifugação.....**45**
- Tabela 5:** Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP do diluente BSUI[®] (BSUI) entre inverno e verão no momento pré-centrifugação.....**45**
- Tabela 6:** Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) no momento pós-centrifugação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.....**46**
- Tabela 7:** Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) no momento pós-centrifugação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.....**47**
- Tabela 8:** Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-centrifugação no inverno.....**48**

Tabela 9: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-centrifugação no verão.....**48**

Tabela 10: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) no momento pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.....**49**

Tabela 11: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) no momento pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.....**50**

Tabela 12: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelação no inverno.....**51**

Tabela 13: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelação no verão.....**51**

Tabela 14: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelação no **inverno** x **verão**.....**52**

Tabela 15: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno.....**53**

Tabela 16: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no verão.....**53**

Tabela 17: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno.....**53**

Tabela 18: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no verão.....	54
Tabela 19: Comparação dos valores médios e desvio padrão da integridade de membrana (%) entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no momento pós-descongelação no inverno e verão.....	55
Tabela 20: Comparação dos valores médios e desvio padrão das patologias espermáticas (defeitos maiores e menores) do sêmen suíno <i>in natura</i> durante o inverno e o verão.....	55
Tabela 21: Somatória das patologias espermáticas de todos os animais em cada uma das estações.....	55
Tabela 22: Níveis médios e desvio padrão de sódio (Na ⁺), potássio (K ⁺) e cálcio (Ca ⁺⁺) no sêmen e no plasma seminal de suínos durante o inverno e o verão.....	56
Tabela 23: Concentrações médias e desvio padrão de frutose e ácido cítrico no sêmen e no plasma seminal de suínos durante o inverno e o verão.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) - barras à esquerda e à direita, respectivamente - entre as diferentes partidas (P1 a P8) nos meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI[®] (BSUI) durante o inverno.....**40**
- Figura 2:** Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) - barras à esquerda e à direita, respectivamente - entre as diferentes partidas (P9 a P14) nos meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI[®] (BSUI) durante o verão.....**41**
- Figura 3:** Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) entre inverno e verão nos meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI[®] (BSUI). (*) indica tendência estatística; letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).....**42**
- Figura 4:** Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP), comparando os meios de congelação BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no inverno e verão no momento pós-centrifugação. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre motilidades progressivas (MP).....**47**
- Figura 5:** Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP), comparando os meios de congelação BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no inverno e verão no momento pós-descongelação. (*, **) indicam tendência estatística ($0,10 < p > 0,05$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre motilidade total (MoT) e letras minúsculas distintas entre motilidade progressiva (MP).....**50**
- Figura 6:** Apresentação semanal dos dados de temperatura e umidade durante o inverno e verão.....**58**

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Descrição da metodologia de dosagem do ácido cítrico seminal segundo Piva & Donida (1980).....**81**

Anexo B: Descrição da metodologia de dosagem da frutose seminal segundo Piva & Donida (1980).....**83**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALH: Amplitude lateral de cabeça

BCF: Frequência de batimento de cauda

BSUI: BSui[®]

BTS: Beltsville Thawing Solution

Ca⁺⁺: Cálcio

CASA: Computer Assisted Sperm Analyser

dL: Decilitro

DP: Desvio padrão

Hz: Hertz

IA: Inseminação artificial

K⁺: Potássio

L: Litro

LH: Hormônio luteinizante

LIN: Linearidade

mg: Miligrama

mmol: Milimol

mL: mililitros

MoT: Motilidade total

MP: Motilidade progressiva

Na⁺: Sódio

ng: Nanogramas

nm: Nanômetros

RAP: Espermatozóides rápidos

STR: Retilinearidade

VAP: Velocidade de trajeto

VCL: Velocidade curvilinear

VSL: Velocidade linear

μg : Micrograma

μl : Microlitro

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERTURA	6
3.1 Congelação do sêmen suíno	7
3.2 Resultados reprodutivos obtidos com uso de sêmen congelado	9
3.3 O futuro da técnica	11
3.4 Efeito da temperatura ambiental sobre a qualidade do sêmen	12
3.5 Influência da sazonalidade sobre a qualidade do sêmen suíno congelado	16
3.6 Níveis de frutose, ácido cítrico, sódio, potássio e cálcio no sêmen suíno	17
3.7 Glicocorticóides como indicadores de estresse	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Local e instalações experimentais	27
4.2 Colheita de dados	28
4.3 Parâmetros de análise dos animais	29
4.4 Colheita de sêmen e fezes	29
4.5 Preparação e transporte do material	30

4.6	Análise dos parâmetros espermáticos.....	32
4.7	Protocolo de congelação.....	33
4.8	Avaliação do sêmen descongelado.....	34
4.9	Análise das características químicas do sêmen.....	34
4.10	Extração e dosagem das amostras fecais.....	35
4.11	Análise estatística.....	37
5.	RESULTADOS.....	38
5.1	Análise dos parâmetros seminais.....	39
5.1.1	<i>Momento pré-centrifugação.....</i>	<i>39</i>
5.1.2	<i>Momento pós-centrifugação.....</i>	<i>46</i>
5.1.3	<i>Momento pós-descongelação.....</i>	<i>49</i>
5.1.4	<i>Integridade de membranas.....</i>	<i>54</i>
5.1.5	<i>Morfologia espermática.....</i>	<i>55</i>
5.1.6	<i>Níveis de sódio, potássio e cálcio.....</i>	<i>56</i>
5.1.7	<i>Concentração de frutose e ácido cítrico.....</i>	<i>57</i>
5.2	Temperatura e umidade.....	57
5.3	Glicocorticóides.....	58
6.	DISCUSSÃO.....	59
7.	CONCLUSÕES.....	67
8.	BIBLIOGRAFIA.....	69
9.	TRABALHO CIENTÍFICO.....	85

VELLOSO, N.M. **Congelamento e efeito do meio sobre as características físico-químicas do sêmen suíno no inverno e verão.** Botucatu, 2011. 102p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da congelação e do meio sobre as características físicas e químicas do sêmen de 10 reprodutores suínos durante o inverno e o verão. No protocolo utilizado para a congelação seminal, 2 diluentes de congelação foram testados em combinação com 2 diluentes de transporte e refrigeração. Os resultados encontrados demonstraram que os parâmetros de integridade de membranas, morfologia e cinética espermática nos momentos que antecederam a congelação não foram influenciados, de forma geral, pela estação do ano. Apesar do número de células espermáticas totais e o volume do ejaculado terem sido superiores no inverno em relação ao verão, a motilidade progressiva pós-descongelação foi melhor no verão do que no inverno na maior parte dos meios de congelação avaliados. A metodologia de congelação aplicada e os diluentes utilizados mostraram índices de viabilidade espermática do sêmen descongelado sem precedentes e superiores aos encontrados na literatura, independentemente do diluente ou da estação do ano avaliada. Em relação ao perfil químico seminal, apenas os níveis de sódio no sêmen e de cálcio no plasma seminal foram mais elevados durante o verão, devido ao menor volume seminal produzido neste período. As temperaturas e umidades foram evidentemente superiores durante o verão e as concentrações de metabólitos fecais de corticosterona mais elevadas nesta mesma estação, porém estes índices não ocasionaram alterações consistentes na viabilidade do sêmen descongelado dos cachorros. Desta forma, os resultados do presente trabalho indicam que os animais encontram-se adaptados ao ambiente, não apresentando alterações marcantes de suas características seminais de acordo com as condições climáticas.

Palavras-chave: suínos, sêmen, congelação, diluentes, clima.

VELLOSO, N.M. **Freezing and effect of environment on the physical and chemical characteristics of boar semen in winter and summer.** Botucatu, 2011. 102p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of freezing and environment on physical and chemical characteristics of the semen of 10 breeding pigs during the winter and summer. In the protocol used for the freezing of semen, 2 freezing extenders were tested in combination with 2 diluents for transport and refrigeration. The results show that the parameters of membrane integrity, sperm morphology and kinetics in the moments preceding the freezing were not affected, in general, by the season. Although the number of sperm cells and the total volume of the ejaculate were higher in winter compared to summer, the post-thaw motility was better in summer than in winter in most media tested for freezing. The freezing methodology and the extenders applied showed indices of viability of the thawed sperm unprecedented and higher than those found in the literature, regardless of the diluents or the season assessed. Regarding the chemical seminal profile, only the levels of sodium and calcium in semen in the seminal plasma were higher during the summer due to lower volume seminal produced in this period. Temperatures and humidities were clearly higher during the summer and the concentrations of fecal corticosterone metabolites higher in the same season, but these rates did not cause consistent changes in the viability of frozen-thawed semen of boars. Thus, the present results indicate that the animals are adapted to the environment, showing no marked changes in their semen characteristics according to the season.

Key words: swine, semen, freezing, extenders, climate.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o quarto país no ranking mundial de produção e exportação de carne suína, sendo esta a mais consumida no mundo. Porém, em nosso país, seu consumo é extremamente baixo quando comparado ao de outros países, principalmente da Europa (ABIPECS, 2010).

A importância da suinocultura brasileira no contexto socioeconômico do país é cada vez mais evidente, por ser esta uma atividade que gera milhares de empregos diretos e indiretos anualmente, incrementando o produto interno bruto por meio das expressivas exportações da carne suína. Desta forma, cada vez mais atenção é despendida na busca pela maximização dos índices reprodutivos dos animais.

Apesar das grandes possibilidades de crescimento do mercado suínico brasileiro, ainda há obstáculos que precisam ser transpostos para permitir o avanço deste setor econômico. Um destes obstáculos são os baixos índices reprodutivos obtidos com o uso de sêmen suíno congelado.

A congelação do sêmen suíno permite a difusão e conservação de doses inseminantes de alto valor genético e apresenta-se como uma alternativa para as situações nas quais o movimento de animais e sêmen é restrito, além de controlar a propagação de doenças sexualmente transmissíveis. Entretanto, esta biotécnica tem sido pouco difundida por apresentar baixos índices de fertilidade.

Temperaturas ambientais acima da zona de conforto térmico e grandes variações diárias de temperatura, bem como altos índices de umidade relativa do ar, podem afetar a espermatogênese e a qualidade do ejaculado, resultando na diminuição do desempenho reprodutivo do macho suíno, afetando libido, tamanho de leitegada e podendo causar infertilidade. Este fator pode ser potencializado pelo uso de inseminação artificial (IA), visto que, neste manejo reprodutivo, cada macho é utilizado na fertilização de um número maior de fêmeas quando comparado à monta natural.

No ano 2000 Johnson et al. estimaram que cerca de 19 milhões de inseminações em suínos eram realizadas no mundo, sendo que destas, menos de 1% envolviam o uso de sêmen suíno congelado (JOHNSON et al., 2000),

cujo uso permanece restrito à preservação e ao transporte de material genético de alto valor por longas distâncias (SCHEID & SILVEIRA, 2002).

O aprimoramento das técnicas utilizadas no sistema de congelação é essencial para o aumento da viabilidade espermática do sêmen descongelado. Deste modo, novos diluentes e diferentes curvas de congelação podem conferir uma maior proteção à célula espermática durante o processo, proporcionando o aumento de sua viabilidade.

Torna-se necessário, ainda, avaliar o impacto dos fatores climáticos sobre a qualidade do sêmen congelado de suínos criados em regime de produção comercial, visto que não há pesquisas que relacionem tais fatores.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

✓ Avaliar as características dos parâmetros espermáticos do sêmen suíno após o transporte e após a descongelação durante o inverno e o verão.

✓ Avaliar e comparar a influência de diferentes meios de transporte e congelação sobre a qualidade do sêmen suíno descongelado.

✓ Avaliar a influência do inverno e verão sobre o perfil químico do sêmen e plasma seminal de suínos.

✓ Avaliar a influência do clima sobre a concentração dos metabólitos fecais de cortisol e corticosterona.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Congelação do sêmen suíno

Atualmente, a maior parte das inseminações é conduzida com sêmen suíno resfriado entre 15 e 18°C, proporcionando resultados de fertilidade semelhantes aos obtidos pelo uso da monta natural. Devido às dificuldades decorrentes da manutenção da temperatura de armazenamento e à limitação de sua utilização por um período máximo de cinco dias, novas metodologias têm sido estudadas para viabilizar o uso de sêmen resfriado a 5°C, ou para aperfeiçoar o processo de congelação. Assim, a expansão da IA em suínos poderia ser ainda maior na medida em que outras tecnologias de criopreservação de sêmen suíno fossem desenvolvidas (SCHEID & SILVEIRA, 2002).

O emprego da inseminação artificial (IA) como biotécnica aplicada à reprodução de suínos foi amplamente difundido ao longo das décadas de setenta e oitenta, consolidando-se nos anos noventa (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

O sêmen suíno criopreservado está disponível para uso comercial desde 1975 (JOHNSON, 1985). Porém, devido à alta susceptibilidade a danos durante o processo de criopreservação e ao complicado processo de congelação, sua utilização não tem sido observada em larga escala, bem como ocorre com o uso do sêmen refrigerado (GROSSFELD et. al, 2008).

Até o início da década de 70, as tentativas de congelação de sêmen suíno resultaram sistematicamente na perda da capacidade fertilizante dos espermatozóides. Progressos consideráveis nesta área foram alcançados apenas nos últimos anos, com o desenvolvimento de tecnologias que permitem a obtenção de leitegadas através do uso de sêmen congelado. Entretanto, os resultados de fertilidade do sêmen suíno congelado ainda situam-se claramente abaixo dos resultados obtidos com a monta natural ou inseminação artificial com sêmen resfriado, impedindo sua utilização em larga escala (SCHEID et al., 1982) e tornando necessário o desenvolvimento de maiores estudos para que a técnica alcance resultados reprodutivos satisfatórios.

Apesar dos esforços para alcançar índices de fertilidade e prolificidade aceitáveis, a sobrevivência espermática após o processo de congelação ainda é consistentemente inferior em comparação com outras espécies. Isto ocorre devido aos danos que ocorrem nas células durante um processo de congelação longo e que rende poucas doses por ejaculado (RODRIGUEZ-MARTINEZ & WALLGREN, 2010).

As mudanças biofísicas provocadas pela transição da água no estado líquido para gelo durante o resfriamento relativamente lento, usado na maioria dos protocolos, são as principais causas de danos à célula espermática. Caso os espermatozoides fossem congelados apenas no plasma seminal (sêmen puro), a congelação tornar-se-ia letal, visto que há formação de gelo tanto dentro quanto fora da célula, danificando as estruturas essenciais, em especial a membrana plasmática e mitocôndrias. Porém, quando o meio contém crioprotetores, os danos ocorrem, mas muitas células irão sobreviver ao processo. Sob estas condições, o gelo se forma no meio de diluição, em torno dos espermatozoides e, como os cristais de gelo crescem na água, que representa a maior parte deste meio extracelular, a quantidade de solvente diminui enquanto o soluto fica mais concentrado (RODRIGUEZ-MARTINEZ & WALLGREN, 2010).

Estudos recentes em criopreservação de sêmen suíno incluíram várias estratégias para melhorar a qualidade do sêmen suíno descongelado e aumentar o número de células espermáticas disponíveis para a fertilização (GROSSFELD et. al, 2008).

As taxas de refrigeração e de congelação são as variáveis mais críticas que influenciam a sobrevivência à congelação e, portanto, são pré-requisitos para um ótimo protocolo de criopreservação (GROSSFELD et. al, 2008).

O espermatozoide suíno criopreservado tem uma meia-vida mais curta (2 a 8h) do que o refrigerado, o que implica na necessidade da IA ser realizada no momento mais próximo possível da ovulação. Isto pode ser assegurado por meio de tratamento hormonal (HCG/ECG) ou, alternativamente, através da detecção intensiva do estro (MARTINEZ et al., 2001, GROSSFELD et. al, 2008).

O comprometimento da qualidade espermática após os processos de congelação e descongelação do sêmen suíno torna necessário o uso de

técnicas capazes de estabelecer taxas de parição satisfatórias com um número relativamente baixo de células espermáticas viáveis por dose inseminante. Esta é uma possibilidade que tem se mostrado viável com o advento da inseminação intra-uterina profunda não-cirúrgica, técnica esta de execução simples, podendo obter bons resultados de fertilidade com o uso de 1×10^9 espermatozóides por dose (MARTINEZ et al., 2001).

Diversos protocolos de congelação de sêmen suíno, como os testados por Bianchi et al. (2005) e Martins et al. (2005), têm sido pesquisados, objetivando obter maior viabilidade espermática pós-descongelação e, assim, melhores índices de fertilidade *in vivo*, tornando economicamente viável o emprego desta biotecnologia (OHATA et al., 2001).

Os trabalhos desenvolvidos nos últimos anos mostram que o glicerol é o melhor crioprotetor para o sêmen de suínos, mas a sua concentração não pode exceder 6% devido a toxicidade química do mesmo para os espermatozóides, sendo a concentração de 3 a 4% a mais utilizada (HOLT et al., 2005). Estudos com a utilização de crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos especialmente em eqüinos com o uso de diferentes amidas (GRAHAN et al., 2001).

3.2 Resultados reprodutivos obtidos com uso de sêmen congelado

As pesquisas realizadas nos últimos 30 anos com o uso de sêmen suíno congelado resultaram em avanços originados, sobretudo, dos estudos efetuados para a avaliação do efeito de diferentes crioprotetores, tipos de palhetas e curvas de congelação e descongelação. No entanto, o emprego de sêmen suíno congelado ainda está associado à redução de 10 a 30% na taxa de parto e de 1 a 3 leitões por leitegada, quando comparado ao uso de sêmen resfriado, restringindo sua utilização em larga escala na suinocultura. (FLOWERS, 1995; BERNARDI et al., 2005).

O aspecto produtivo é o principal fator limitante para o uso de sêmen suíno congelado em granjas comerciais na atualidade, pois enquanto o sêmen resfriado obtém médias anuais de taxa de parto acima de 88% e número de nascidos totais acima de 10 leitões por parto, com o uso do sêmen congelado

as taxas de parto, na maioria das vezes, não alcançaram 85% e os nascidos totais não ultrapassaram os 10 leitões por parto (ROMERO et al., 2004).

A redução do desempenho reprodutivo e as dificuldades no processamento fazem com que o emprego de sêmen congelado fique restrito ao campo experimental, a exportação de sêmen entre países, ao transporte de doses por longas distâncias e a formação de bancos de sêmen de raças ou linhagens de alto valor genético, ou que se encontram em via de extinção ou em risco sanitário (BORTOLOZZO et al., 2005). A aplicação comercial da técnica dependerá da otimização das condições de congelação e/ou da técnica de inseminação, as quais estão sendo objeto de pesquisa (BERNARDI et al., 2005).

Durante os processos de resfriamento, congelação e descongelação, os espermatozóides são expostos a situações adversas a sua homeostase, tornando-os susceptíveis aos choques térmico e osmótico, que podem promover alterações estruturais e funcionais na célula espermática com prejuízos para sua motilidade (BUHR et al., 1994; HOFMO & ALMLID, 1991). Também ocorrem degeneração do acrossoma e redução da atividade metabólica da célula, as quais influenciam a capacidade fecundante do espermatozóide e sua viabilidade no trato genital feminino (HOFMO & ALMLID, 1991; SILVEIRA et al., 2006).

Pesquisando sobre a capacidade de fertilização *in vitro* do sêmen suíno submetido ao processo de congelação, Córdova et al. (1997) relataram que tal aptidão dos espermatozóides suínos após a descongelação foi de 68%, enquanto no sêmen resfriado o valor encontrado foi de 85%.

Outro fator limitante para a expansão do uso de sêmen suíno congelado é a grande variabilidade na resposta dos machos suínos à congelação, a qual não é possível de ser identificada, até o momento, pelos parâmetros convencionais de avaliação do sêmen *in natura* (MARTINS et al., 2005; BERNARDI et al., 2005). Ainda de acordo com os autores, deve-se considerar também a instabilidade da célula espermática do suíno quando comparada a outras espécies no processo de congelação, o que provavelmente ocorre devido às características da composição da sua membrana celular.

Segundo Silveira et al. (2006), foram observadas diferenças de até 27% entre os machos nos índices de motilidade após a descongelação. Uma das

possíveis causas desta marcante diferença entre indivíduos pode ser explicada pelas pesquisas de Park & Yi (2002), que demonstraram que as variações dos níveis de testosterona presentes em cada animal apresentam correlação positiva com a capacidade do sêmen suíno de ser congelado-descongelado.

Não foi encontrada associação entre a sensibilidade ao resfriamento e a viabilidade do sêmen após a descongelação. O fato dos machos responderem à congelação de forma diferente da prevista dificulta o processo de seleção de doadores para a congelação de sêmen (OHATA et al., 2005).

Os resultados insatisfatórios obtidos com sêmen suíno congelado também foram atribuídos à ineficiência dos diluentes e crioprotetores, sugerindo que novas soluções crioprotetoras e metodologias diferentes de congelação devem ser testadas (KUSTER & ALTHOUSE, 1999).

Sob o aspecto econômico e prático, a utilização da criopreservação aumentou os custos por fêmea inseminada e dose produzida, visto que foi necessário praticamente dobrar o número de espermatozóides por dose, reduzindo o rendimento dos ejaculados (BORTOLOZZO et al., 2005). Além disso, a técnica de conservação foi relativamente demorada e complexa, sendo necessárias 7-9 horas para o processamento de um ejaculado (WENTZ & BORTOLOZZO, 1998).

Desta forma, os baixos índices de fertilidade, os protocolos extremamente laboriosos e a variação na congelabilidade entre os doadores de sêmen têm dificultado o emprego rotineiro de sêmen suíno congelado (OHATA et al., 2005).

3.3 O futuro da técnica

Apesar dos dados atuais de produtividade com sêmen suíno congelado serem desanimadores em termos de perspectivas do uso da técnica em rebanhos comerciais, alguns pesquisadores, como Smits (2006), apontaram para um futuro promissor da técnica, com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelação de sêmen.

A conservação do sêmen por meio de criopreservação é um dos objetivos das pesquisas na área da biotecnologia da reprodução e muitos

pesquisadores tentam aprimorá-la. Quando ela estiver dominada, trará um grande impulso aos programas de IA, possibilitando o acesso de produtores ao sêmen de machos selecionados, independente da distância que os separa das centrais de IA (WATSON & BEHAN, 2002).

O uso de sêmen suíno congelado em nível comercial ainda não é uma realidade, mas os avanços tecnológicos nas áreas de conhecimento de bioquímica de membranas dos espermatozóides e o desenvolvimento de novos equipamentos automatizados para congelamento, combinado aos avanços nas metodologias de avaliação e maior conhecimento do ciclo estral da fêmea suína que permitirá um melhor ajuste do “timing” da deposição do sêmen em relação à ovulação, prometem tornar esta técnica comercialmente viável, em nível de granjas comerciais, muito em breve (ANTUNES, 2007).

Possivelmente, a associação com a prática de inseminação pós-cervical poderá incrementar os resultados de campo com uso de sêmen suíno congelado, pelo fato dos espermatozóides serem depositados profundamente no trato genital, reduzindo perdas espermáticas durante o transporte até o sítio de fecundação (SILVEIRA et al., 2006).

3.4 Efeito da temperatura ambiental sobre a qualidade do sêmen

No Brasil, país de clima predominantemente tropical, os meses de outubro a março, que englobam o final do outono, o verão e o início da primavera, são marcados por calor intenso (INMET, 2011).

A infertilidade sazonal é um problema bem conhecido da moderna indústria suinícola. Altas temperaturas ambientais podem contribuir diretamente para a infertilidade sazonal que ocorre devido ao estresse fisiológico dos animais (YANG et al., 2010).

De acordo com Hannas (1999), fatores ambientais externos e o microclima dentro das instalações exercem efeitos diretos e indiretos sobre os suínos em todas as fases de produção e acarretam em redução da produtividade com conseqüentes prejuízos econômicos para a exploração suinícola.

A zona de termoneutralidade para reprodutores suínos encontra-se entre 18 e 22°C (SCHEID & SILVEIRA, 2002; MOURA, 1999). Já a umidade relativa do ar ideal para suínos em todas as fases é de 50 a 70% (MOURA, 1999).

O alojamento de cachaaos em instalaçoes onde as temperaturas excedem os limites máximos desejáveis tem como consequência o subaproveitamento de machos de alto valor genético. Estes animais, quando não se encontram em sua zona de conforto térmico, têm sua produção espermática diminuída, além de apresentarem maiores taxas de alterações espermáticas, o que se traduz em menor qualidade seminal (SCHEID & SILVEIRA, 2002).

Os suínos têm pouca capacidade de transpirar quando se encontram termicamente estressados (MCNITT et al., 1972) por apresentarem uma espessa camada de tecido adiposo subcutâneo e reduzido número de glândulas sudoríparas na pele (DYCE et al., 1997).

Desta forma, uma redução no desempenho reprodutivo dos machos suínos durante ou imediatamente após um período de altas temperaturas pode, muitas vezes, ser observada (KUNAVONGKRIT et al., 2005). Contudo, alguns machos mais sensíveis ao calor podem ser mais afetados do que outros que possuam maior tolerância a altas temperaturas (CAMERON & BLACKSHAW, 1980).

Assim, quando a temperatura ambiente ultrapassa o limite da zona de conforto, os suínos reagem dissipando calor por mecanismos de convecção, condução, radiação e evaporação. Porém, se tais condições ambientais inadequadas persistirem poderão, em alguns casos, causar a morte destes animais e, mais comumente, prejudicar o desempenho reprodutivo dos animais destinados à reprodução (MYER & BUCKLIN, 2001).

Diversos estudos realizados sob condições controladas de temperatura e umidade demonstraram que as células espermáticas são afetadas pelos elementos climáticos, e a gravidade das lesões depende da intensidade do estresse térmico e do período de exposição a eles (HANNAS, 1999).

Cachaaos submetidos a altas temperaturas ambientais têm sua fertilidade reduzida, pois, de acordo com Suriyasomboon (2005), tais condições podem causar uma degeneração testicular leve à moderada. Estes machos produzirão ejaculados com menor concentração de espermatozoides, alta

porcentagem de células espermáticas anormais e diminuição da motilidade e do volume espermático, podendo ser observado maior número de espermatozóides com anormalidades de cabeça e com gota protoplasmática proximal (MALMGREN, 1988).

Células que apresentam defeitos maiores têm sua viabilidade e capacidade de fecundação reduzidas, comprometendo as funções espermáticas em diferentes níveis. Estes defeitos englobam alguns tipos de alterações mais severas na cabeça e cauda espermáticas, gota protoplasmática proximal e defeitos de peça intermediária. Já os defeitos menores, cujos danos às células são menos severos que os ocorridos nos defeitos maiores, representam lesões mais brandas de cabeça e cauda e gota protoplasmática distal (CHENOWETH, 2005).

Em suas pesquisas, Sydenstricker (1993) afirmou que machos submetidos a altas temperaturas ambientais podem apresentar alterações na espermatogênese, devido ao aquecimento local dos testículos e ao desequilíbrio hormonal e metabólico decorrentes do estresse, comprometendo a qualidade do sêmen.

De acordo com Myer & Bucklin (2001), temperaturas acima de 29°C causaram redução da produção e da qualidade dos espermatozóides. Estienne (2000) indicou em suas pesquisas que o tempo mínimo de exposição e temperatura crítica do ar para que a produção de células espermáticas fossem afetadas foi de 72 horas e 29,4°C, respectivamente.

Com exceção da motilidade espermática e da atividade da enzima fosfatase alcalina presente no sêmen, todas as demais características do líquido seminal variaram de acordo com o mês (TRUDEAU & SANFORD, 1986). O número de espermatozóides, assim como outros parâmetros de qualidade seminal, foi melhor durante o outono e inverno do que na primavera e verão (TRUDEAU & SANFORD, 1986; CIERESZKO et al., 2000; SMITAL, 2009).

Suriyasomboon et al. (2004) encontraram significativo efeito sazonal sobre a porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais e anormais com defeitos como gota citoplasmática proximal e anomalias na cabeça espermática, que são características de degeneração testicular.

Alterações na qualidade seminal de suínos selvagens nas diferentes estações do ano também foram observadas por Kozdrowski & Dubiel (2004). Segundo eles, os ejaculados de suínos selvagens não diferiram dos ejaculados de suínos domésticos, sendo que o sêmen apresentou maior volume, concentração e número de espermatozóides totais no final do outono, e a motilidade espermática foi menor no verão do que nas demais estações. Houve ainda uma expressiva correlação entre concentração espermática e volume da fração líquida do ejaculado. Tais resultados comprovaram que a influência climática sobre a qualidade seminal é um fator inerente à espécie, não dependendo da linhagem genética dos animais.

Estienne (2000) relatou que um período de aproximadamente duas semanas é normalmente observado entre o estresse calórico agudo e as primeiras indicações na produção de espermatozóides anormais. Paquignon (1987) afirmou que os danos espermáticos normalmente ocorrem entre 15 a 21 dias após a exposição e que a qualidade do ejaculado retorna ao normal em um período de 7 a 8 semanas após cessar a exposição a altas temperaturas.

Já nas pesquisas desenvolvidas por Wettemann et al. (1979) e Stone (1982), foi observado um período de 5 semanas após o fim da exposição dos animais a altas temperaturas para que o percentual de células espermáticas móveis atingisse novamente seus valores normais. Curtis (1983) indicou em seu trabalho que um intervalo de quatro a seis semanas após o fim do estresse calórico foi necessário para que os índices de fertilidade alcançassem seus valores normais.

Cachaços submetidos a condições de estresse calórico sofreram diminuição da circulação de testosterona, o que provavelmente contribuiu com a diminuição da libido (ESTIENNE, 2000). Este fato pôde ser confirmado pelos estudos desenvolvidos por Kozdrowski & Dubiel (2004), nos quais a massa testicular e o nível de testosterona de cachacos adultos foram significativamente maiores no inverno, quando comparados ao verão.

3.5 Influência da sazonalidade sobre a qualidade do sêmen suíno congelado

Apesar dos importantes avanços alcançados na criopreservação de sêmen suíno e em seu uso para IA (GROSSFELD et al., 2008), o mesmo não tem sido rotineiramente utilizado devido a instabilidade de suas taxas de fertilidade, que variam de 40 a 85% (WONGTAWAN et al., 2006).

Vários fatores podem explicar esta variação, incluindo diferenças na qualidade do sêmen descongelado, o número de espermatozoides utilizados por dose inseminante e o intervalo entre a ovulação e a IA (ROCA et al., 2006). Entretanto, outros fatores sabidamente afetam o desempenho reprodutivo dos suínos, como o ambiente e a época do ano (PELTONIEME & VIROLAINEN, 2006).

O comprometimento sazonal da reprodução dos suínos é evidente em todo o mundo. Uma clara redução da fertilidade ocorre durante o verão e o início do outono (SURIYASOMBOON, 2005). Porém, estudos complementares que correlacionem a estação do ano com a utilização de sêmen suíno congelado ainda não estão disponíveis (BOLARÍN et al., 2009).

Esta escassez de dados pode ser parcialmente atribuída à grande variação do desempenho reprodutivo dos animais nos diferentes estudos já publicados. Uma melhor compreensão do impacto do período do ano sobre a capacidade fecundante do sêmen criopreservado poderia ajudar a explicar as diferenças entre os ensaios com porcas inseminadas com sêmen descongelado. Tal entendimento poderia também facilitar o desenvolvimento de estratégias refinadas de IA, visando alcançar altas taxas de fertilidade e prolificidade com a utilização de sêmen criopreservado durante todo o ano (BOLARÍN et al., 2009).

Em experimentos conduzidos com porcas mestiças em condições de clima mediterrâneo, Bolarín et al. (2009) observaram menores taxas de parição e tamanho de leitegada, além de maior taxa de retorno ao cio, durante o verão e outono, quando comparadas as demais estações do ano. Este padrão foi similar ao obtido com o uso de sêmen refrigerado. No entanto, a magnitude da variação entre os períodos do ano diferiu entre o uso do sêmen refrigerado e criopreservado. O aumento da taxa de retorno ao cio e a redução da taxa de

parição durante o verão foram mais acentuados em porcas submetidas a IA com o uso de sêmen criopreservado.

3.6 Níveis de frutose, ácido cítrico, sódio, potássio e cálcio no sêmen suíno

A frutose é um marcador da função secretora das vesículas seminais importante para a sobrevivência dos espermatozóides em condições anaeróbicas, e que está estreitamente relacionada com a motilidade inicial das células espermáticas. Ela é um constituinte do plasma seminal, e não da célula espermática, sendo o principal carboidrato do sêmen. Portanto, seus níveis não sofrem diminuição devido ao aumento na frequência de colheitas (MANN, 1948).

De acordo com Piva & Donida (1980), a frutose tem função de servir como substrato para o metabolismo dos espermatozóides. A glicose é o substrato mais importante durante o período de formação e maturação dos espermatozóides. Quando estes se tornam móveis, devido ao contato com substâncias oriundas principalmente da próstata, o seu metabolismo passa a ser anaeróbico e a frutose passa a ser a principal fonte de energia dos gametas enquanto no esperma, pois, ainda segundo os autores, a glicose volta a ser importante durante a passagem e estocagem de esperma pelo canal cervical, cujo muco é pobre em frutose.

Níveis baixos de frutose geralmente indicam deficiência na atividade secretora das vesículas seminais (FILIPPINI et al., 2001) ou processos inflamatórios ou infecciosos (PIVA & DONIDA, 1980).

Em geral, espécies cujo sêmen possui alta concentração espermática apresentam, proporcionalmente, menor concentração de frutose, como o do suíno que raramente excede 50mg/100mL (MANN, 1948).

Mann (1954) propôs que os níveis de frutose no sêmen podem ser utilizados como um indicador da atividade dos hormônios testiculares, mas em relato posterior, Mann (1956) reconheceu que uma ampla variação nos níveis de frutose ocorre em machos férteis e que muitos outros fatores além da testosterona afetam os níveis de frutose.

Segundo Hupp et al. (1961), suínos tratados com aplicação de testosterona exógena apresentaram um aumento nos níveis de frutose seminal. Porém, os níveis de frutose antes do tratamento diferiram amplamente entre os animais, e a resposta à testosterona foi dependente dos níveis já presentes antes das aplicações.

Já os autores Humphrey & Mann (1949) afirmam que a produção e a manutenção do ácido cítrico e da frutose no sêmen são reguladas diretamente pela produção testicular de testosterona, sendo o ácido cítrico metabolizado muito mais lentamente do que a frutose. Piva & Donida (1980) também descrevem a frutose como sendo uma substância androgênica dependente. Porém, segundo Hupp et al. (1961), os níveis de ácido cítrico no sêmen suíno não são influenciados pela testosterona.

O ácido cítrico é produzido pela próstata e reflete a atividade secretora da glândula prostática, possuindo um importante papel como ativador da fosfatase ácida, mantendo também o equilíbrio osmótico, junto com o sódio e o potássio, favorecendo, assim, a motilidade dos espermatozóides (MANN, 1948). Ele também potencializa a atividade da hialuronidase e estabiliza o processo de coagulação-liquefação (FILIPPINI et al., 2001). Em casos de prostatites, o ácido cítrico geralmente se encontra diminuído (PIVA & DONIDA, 1980).

O sêmen suíno apresenta baixos níveis de frutose (50 mg/100 mL) (FOLEY et al., 1964) e altos níveis de ácido cítrico (130 mg/100 mL) (HUMPHREY & MANN, 1949) em comparação com outras espécies.

Pesquisas desenvolvidas com sêmen de carneiro demonstraram uma maior concentração destas substâncias no sêmen durante as estações outono e inverno (HUMPHREY & MANN, 1949). Segundo eles, os níveis de ácido cítrico no sêmen são dependentes da maturidade sexual do animal, sendo inferior em animais jovens.

Pineda (1989) afirma que a atividade metabólica e a capacidade do espermatozóide de sobreviver ao congelamento apresentam variações relacionadas com a estação. Segundo o autor, os espermatozóides colhidos no inverno utilizam mais frutose do que os colhidos no verão.

Os valores basais de sódio e potássio no plasma seminal dos suínos é de, respectivamente, 0,23 mg/mL e 0,46 mg/mL (HOOD et al., 1970), sendo os

níveis de potássio intracelular diretamente relacionados com a motilidade espermática no sêmen de carneiros (DOTT & WHITE, 1964).

Em trabalho realizado com bovinos, Cragle et al. (1958) demonstraram que o nível de potássio é mais elevada no interior da célula espermática do que no plasma seminal. Inversamente, sódio e cálcio apresentaram maiores níveis no plasma seminal. Os níveis destes elementos no sêmen variam de acordo com o indivíduo e com o ejaculado.

Pode-se especular que a incapacidade dos espermatozóides imaturos no epidídimo a exibir motilidade deve-se à sua incapacidade de manter os gradientes de eletrólitos necessários (ZIMMERMAN et al, 1979).

Utilizando uma técnica para investigar o transporte de eletrólitos através das membranas celulares dos espermatozóides suínos, Crabo et al. (1976) verificaram que a redução da concentração de proteínas no meio alterou significativamente a taxa de absorção de potássio, mas não a de sódio.

Uma alteração fisiológica na membrana espermática, medida pela taxa de transporte de sódio e potássio, foi realizada pela exposição do espermatozóide suíno ao plasma seminal do epidídimo. Desta forma, pode-se concluir que a taxa de transporte destes solutos pela membrana plasmática do espermatozóide poderia representar um aspecto importante da aquisição de capacidade fertilizante dos espermatozóides (CRABO et al., 1976; ZIMMERMAN et al, 1979). Ainda segundo Zimmerman et al. (1979), as alterações na membrana, que permitem à célula manter o gradiente de sódio em relação ao plasma, são necessárias para a manutenção da motilidade espermática.

Segundo HOOD et al. (1970), o aumento do sódio e a diminuição do potássio podem ser observadas quando o espermatozóide é submetido ao choque térmico por baixas temperaturas. Amostras espermáticas provenientes de ejaculados acrescidos de diluentes apresentam maiores níveis de sódio quando submetidas ao choque térmico, em comparação com amostras provenientes de sêmen puro.

De acordo com os autores, a utilização de glicerol na composição do diluente pode controlar o aumento dos níveis de sódio e reduzir as perdas de potássio.

As principais alterações nos níveis de cátions do plasma seminal, que podem causar amplos efeitos sobre a célula espermática, são observadas entre 16 e 6°C. Isto indica que temperaturas abaixo dos 16°C ou a rápida redução de mais de 10°C é necessária para ocasionar os severos efeitos do choque térmico sobre o conteúdo de cátions (HOOD et al., 1970).

O papel do cálcio no sêmen suíno está relacionado ao fenômeno de capacitação espermática, que ocorre no trato genital feminino e é essencial para a fertilização (DUBÉ et al., 2003). Arnoult et al. (1999) observaram que o cálcio intracelular está intimamente relacionado com a excitose acrossomal.

Outros autores, como Visconti & Kopf (1998) e Flesch e Gadella (2000), por sua vez, mostraram que o nível de cálcio intracelular não é alterado durante a capacitação. Parte desta controvérsia pode ser atribuída pela ação do cálcio na reação acrossomal e na inerente dificuldade em diferenciar esses eventos (VISCANTI & KOPF, 1998). Para Flesch e Gadella (2000) é difícil avaliar o papel direto que o cálcio exerce sobre a fosforilação do aminoácido tirosina, pois vários processos necessitam dele e há diferenças entre espécies.

Em experimento conduzido com espermatozoides eqüinos, Gadella et al. (2001) relataram que durante a capacitação o nível de cálcio intracelular aumenta e se mantém constante até a indução da reação acrossomal, momento em que ocorre um segundo influxo de cálcio e fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática liberando, deste modo, as enzimas responsáveis pela lise da zona pelúcida (ANDRADE, 2009).

Um dos resultados da capacitação é o aumento da permeabilidade da membrana ao cálcio, o que permite o rápido movimento do cálcio para o interior da célula espermática. Este influxo de cálcio é necessário para possibilitar a fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, dando início à reação acrossômica dos espermatozoides dos mamíferos (SINGH et al., 1978).

O cálcio entra no espermatozoide de uma forma bifásica, com uma pequena elevação inicial de cálcio intracelular durante a capacitação, seguido por uma maior elevação que ocorre no momento da reação acrossômica (ADEOYA-OSIGUWA & FRASER, 1993).

Em várias espécies, entre elas o suíno (FLESCHE et al., 1999), a fosforilação do aminoácido tirosina das proteínas espermáticas está

diretamente relacionada ao processo de capacitação, que é acompanhado pelo aumento do nível de cálcio intracelular, do pH e da adenosina-monofosfato cíclica (AMPc) (PONS-REJRAJI et al., 2009).

Já Andrade (2009) afirma que a fosforilação das proteínas, responsável por regular funções espermáticas como motilidade e reconhecimento da zona pelúcida, além de servir como um significativo indicador da evolução da capacitação espermática, é promovida pela ação de fatores auxiliares da capacitação, como o bicarbonato e o cálcio.

Landim-Alvarenga et al. (2004) indicaram que a congelação do sêmen de bovinos e eqüinos produz alterações na membrana plasmática dos espermatozoides, permitindo um rápido influxo de cálcio para o interior da célula, o que não foi observado no sêmen *in natura*.

Apesar de relatos anteriores demonstrarem a importância e os níveis destas substâncias no sêmen suíno, trabalhos que avaliem a interferência que o estresse térmico pode acarretar sobre as mesmas ainda são escassos. Sendo assim, a mensuração destes parâmetros em diferentes períodos do ano se faz importante para que seja possível avaliar a interferência das condições ambientais sobre as características químicas do sêmen suíno.

3.7 Glicocorticóides como indicadores do estresse

O interesse pelo bem estar animal é crescente não somente entre os cientistas, mas também por parte da população. Maneiras de definir e quantificar o bem estar dos animais de produção ainda são amplamente debatidas. Um potencial indicador do bem estar animal seria a ausência de estresse, porém não é possível padronizar a definição de estresse e não há exames bioquímicos capazes de mensurá-lo de maneira direta. Desta forma, é necessário avaliar parâmetros bioquímicos e endócrinos para possibilitar a detecção deste fator (MÖSTL & PALME, 2002).

A correlação entre o estresse causado pelas altas temperaturas ambientais e a diminuição de volume do sêmen e da concentração espermática pode ser atribuída à indução da produção excessiva de hormônios corticosteróides ocasionada pelo estresse. Contudo, os suínos geralmente são

muito bem adaptados ao meio ambiente e, quando se encontram em instalações com temperaturas elevadas, o hormônio do estresse (cortisol) aumenta rapidamente, mas nas 72 horas seguintes retorna praticamente aos níveis normais. Isto indica a adaptação dos suínos às diversas temperaturas ambiente, embora as temperaturas altas durante o dia e baixas durante a noite dificultem a adaptação (KUNAVONGKRIT et al., 2005).

Segundo Palme et al. (2005), os glicocorticóides mais importantes e biologicamente relevantes são o cortisol e a corticosterona, e o que será predominantemente excretado irá variar conforme a espécie. Nos animais, ambos os hormônios estão presentes e a relação entre eles pode mudar durante os diferentes estágios da vida. Além disso, os dois glicocorticóides podem apresentar diferentes funções no organismo. A corticosterona foi relatada como sendo o glicocorticóide predominante no cérebro, apesar de ser o cortisol o principal glicocorticóide na circulação periférica.

A quantidade de metabólitos de glicocorticóides excretada via fezes também varia em função da espécie e do sexo (PALME et al., 1996). Touma et al. (2003) demonstraram esta diferença pela primeira vez em ratos, onde a concentração dos metabólitos hormonais de glicocorticóides foi claramente maior nos machos.

A produção e liberação de hormônios como o cortisol são influenciadas por situações estressantes, podendo afetar os animais de diversas maneiras e intensidades, estando o desempenho reprodutivo subordinado aos níveis deste hormônio (DOBSON & SMITH, 1995).

Os agentes estressores produzem estímulos no sistema nervoso periférico, atingindo as células neuro-secretoras do hipotálamo. Estas, por sua vez, promovem a liberação do hormônio CRF (fator de liberação de corticotropina), que irá agir na hipófise anterior, havendo um aumento imediato da secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o qual atinge, via circulação sanguínea, a córtex da glândula adrenal, que irá estimular a conversão do colesterol em glicocorticóides, sendo o principal deles o cortisol (JUNIEWICZ & JOHNSON, 1981).

Para demonstrar a quantidade de cortisol excretada via urina e fezes, Palme et al. (1996) aplicaram cortisol radioativo por via intravenosa em ovinos, pôneis e suínos. Eles coletaram amostras de urina e fezes e observaram que o

pico de radioatividade na urina foi observado momentos após a injeção da substância. Contudo, a concentração máxima nas fezes ocorreu após 12 horas em ovelhas, 24 horas em pôneis e 48 horas em suínos, o que reflete o tempo de passagem intestinal nestas espécies.

As concentrações fecais de metabólitos de cortisol refletem a quantidade total excretada, produzindo, portanto, uma estimativa melhor do que a obtida com uma única amostra de sangue, que muda rapidamente. A análise das fezes permite estudos em larga escala longitudinal, de modo que cada animal age como controle de si próprio, diminuindo a variação (MÖSTL & PALME, 2002).

Em um estresse agudo, os glicocorticóides melhoram a capacidade do organismo de mobilizar energia, permitindo alterações comportamentais benéficas aos animais. Contudo, um estresse crônico severo pode causar imunodepressão e atrofia dos tecidos (MUNCK et al., 1984).

O estresse ambiental, demonstrado pelas elevadas concentrações plasmáticas de cortisol, exerce efeitos pronunciados sobre várias características sangüíneas, hormonais e bioquímicas (NAZKI & RATTAN, 1991). Alguns autores demonstraram que, sob altas temperaturas, na fase aguda do estresse térmico, ocorreu elevação da concentração sangüínea de cortisol (RUCKEBUSCH et al., 1991; MCFARLANE et al., 1995, MÖSTL & PALME, 2002).

O colesterol é o componente básico para a produção dos hormônios esteróides, como a progesterona, estrógeno e a testosterona (JUNIEWICZ & JOHNSON, 1981). Desta maneira, o redirecionamento do colesterol para a produção de cortisol poderá afetar o desempenho reprodutivo das fêmeas e machos reprodutores (DOBSON & SMITH, 1995).

O processo reprodutivo é particularmente afetado pelo estresse, pois o cortisol age inibindo a secreção e a freqüência de liberação dos hormônios gonadotróficos. Em seguida, uma cascata de outros eventos hormonais pode resultar em uma pequena redução da eficiência reprodutiva até a completa infertilidade (DOBSON & SMITH, 1995).

De acordo com Dickson (1996), o excesso de glicocorticóides tem sido apontado como inibidor da liberação de LH tanto em machos quanto em fêmeas, bem como sendo capaz de melhorar a capacidade dos esteróides

sexuais no efeito supressor das gonadotropinas através de *feedback* negativo, podendo contribuir para a capacidade dos glicocorticóides em retardar o início da puberdade.

Sob condições normais, a via hipotálamo-hipófise-adrenal mantém-se equilibrada, apresentando taxas basais de cortisol. Porém, em situações estressantes, os glicocorticóides liberados são capazes de prejudicar o sistema imunológico, tornando o animal susceptível a doenças (BORGHETTI et al. 2006). Desta forma, o estresse, independente de sua natureza, também exerce efeitos sobre o sistema imunológico dos suínos.

A análise da concentração do cortisol nas fezes é um interessante método de avaliação do estresse. Trata-se de um método não-invasivo, confiável e de baixo nível de dificuldade. É ideal para a análise fisiológica, uma vez que não necessita da contenção do animal, causando assim mínimas condições de estresse (CARLSSON et al., 2007; QUEYRAS & CAROSI, 2004).

Outra justificativa para o emprego deste tipo de abordagem é o fato dos dados obtidos representarem a atividade secretora de uma determinada glândula durante certo tempo, ao invés de episódios isolados como no caso das dosagens sanguíneas (MORAIS, 1999) ou de urina (MÖSTL & PALME, 2002).

Enzimas bacterianas são a principal fonte de degradação dos metabólitos fecais de glicocorticóides, podendo alterar seus níveis caso a amostra não for congelada rapidamente (TOUMA & PALME, 2005).

Em suínos, os níveis basais de cortisol no sangue são geralmente maiores no período da manhã (BECKER et al., 1985), sendo a proporção dos metabólitos do cortisol excretados pelas fezes nos suínos de 7% (MORMÈDE et al., 2007; PALME et al., 1996).

Como o intervalo entre a secreção do cortisol no sangue e a excreção de seus metabólitos pelas fezes é longo nos suínos (MORMÈDE et al., 2007), levando em média dois dias e podendo alcançar quase cinco dias (PALME et al., 1996), a análise dos metabólitos através deste excremento não sofre interferência direta do ritmo circadiano, visto que tal análise reflete um relativo longo período de tempo quando comparada com dosagens efetuadas através de amostras de saliva ou sangue.

O nível de metabólitos de cortisol nas fezes é resultado da acumulação de cortisol por um período prolongado de tempo, podendo não refletir as flutuações plasmáticas dos níveis de cortisol, especialmente se estas flutuações forem breves (QUEYRAS & CAROSI, 2004)

As concentrações fecais de metabólitos de cortisol refletem a quantidade total excretada e, portanto, permitem uma estimativa mais precisa do que uma única avaliação da concentração plasmática, que varia em períodos curtos de tempo (MÖSTL & PALME, 2002).

Corticosteróides são predominantemente excretados pela urina na maioria das espécies (PALME et al., 1996). Contudo, a colheita de urina requer restrição ou manipulação do animal, procedimentos que podem alterar os resultados (HOPSTER et al., 1999).

Em algumas espécies, há predominância dos níveis plasmáticos de cortisol ou de corticosterona, porém em suínos ambos os glicocorticóides são produzidos, sendo estes os principais hormônios envolvidos na resposta a estímulos estressantes (BROOM & JOHNSON, 1993; apud QUEYRAS & CAROSI, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e instalações experimentais

O trabalho experimental foi realizado nos meses de junho e julho de 2009 e janeiro e fevereiro de 2010, em uma granja comercial de suínos localizada no município de Capivari, Estado de São Paulo, a 170 km de Botucatu. A granja situa-se na latitude 22°59'42" sul e longitude 47°30'28" oeste, estando a uma altitude de 636 metros acima do nível do mar.

A propriedade é de criação intensiva confinada, ciclo completo e organização semanal da produção, possuindo aproximadamente 3000 matrizes e 26 cachaços, dos quais dez fizeram parte desta pesquisa.

Todos os animais foram alojados em baias individuais providas de piso de concreto, cocho para ração e bebedouro tipo chupeta. Cada baia individual possui uma área de 9m².

O galpão possui pé direito medindo 2,80 metros e localiza-se em uma área sombreada e cercada por árvores, sendo coberto por telhas de barro e equipado com ventiladores, cujo acionamento ocorria manualmente nos dias mais quentes. Ainda neste mesmo galpão de alojamento dos reprodutores havia fêmeas em diferentes estágios reprodutivos.

A ração fornecida aos machos reprodutores do experimento era produzida na fábrica de ração da própria granja. Esta ração foi balanceada e direcionada a atender os requerimentos nutricionais dos animais da genética utilizada na propriedade, seguindo as instruções fornecidas pela empresa de genética responsável pela venda dos reprodutores.

A composição nutricional, física e condições de manejo da ração não variaram de acordo com a estação do ano, embora se reconheça a existência da necessidade destas mudanças em virtude do menor consumo de ração sob altas temperaturas.

A granja possui controle do fluxo de pessoas, veículos e animais e são tomadas medidas que visam manter a biossegurança da unidade de produção evitando, assim, a entrada de agentes que possam causar doenças no plantel.

Os reprodutores do plantel passam por avaliações andrológicas quinzenais, que são realizadas por um Médico Veterinário especialista em reprodução de suínos que assessora a propriedade quanto aos seus índices reprodutivos. Isto garante que os resultados produtivos e reprodutivos obtidos nesta granja sejam diferenciados e mantenham-na entre as melhores do estado de São Paulo.

Todos os manejos da criação, incluindo a colheita do sêmen, permaneceram sob total responsabilidade da propriedade.

4.2 Colheitas de dados

Semanalmente, foram colhidas amostras de sêmen e de fezes de cada um dos animais. Na primeira etapa da colheita de dados, nos meses de junho e julho, os dez animais do experimento foram colheitados durante oito semanas, perfazendo um total de 80 amostras de cada material. Porém, na segunda etapa, realizada entre os meses de janeiro e fevereiro, três animais haviam sido descartados devido a lesões no aparelho locomotor e as amostras foram colhidas durante seis semanas. Desta forma, durante o verão 42 amostras de cada material foram obtidas.

Para facilitar a organização do experimento, cada semana de colheita de dados foi considerada como uma partida. Desta forma, a primeira semana corresponde à partida 1 (P1), a segunda semana à partida 2 (P2) e assim por diante.

Tanto as amostras de sêmen quanto as de fezes foram colhidas no mesmo dia da semana, em intervalos regulares de sete dias, e sempre no período matutino. Isto garantiu uma constância no intervalo entre colheitas ao longo do experimento, sem que houvesse interferência de uma alta ou baixa frequência de colheitas sobre os parâmetros de qualidade seminal.

Os dados do ambiente interno das instalações onde os machos estiveram alojados foram colhidos através de cinco registradores e acumuladores de dados ou *data logger* (Onset HOB0 U12/012), que obtiveram os índices de temperatura e umidade relativa do ar a cada 30 minutos durante os quatro meses avaliados. Estes sensores foram posicionados na mesma

altura em que os animais se encontravam para que os dados climáticos fornecidos fossem equivalentes àqueles vivenciados pelos animais.

4.3 Parâmetros de análise dos animais

Participaram do experimento machos reprodutores em idade fértil, com idade média de 2 anos e 350 kg de peso vivo, com estado de saúde e desempenho reprodutivo satisfatório e comprovado. Para isto, uma análise prévia da qualidade seminal e do estado físico geral dos cachos foi realizada para excluir do experimento animais com índices reprodutivos abaixo da média, além de portadores de doenças ou outros fatores capazes de ocasionar o descarte prematuro dos animais no decorrer da pesquisa ou comprometer os resultados da mesma.

Todos os animais utilizados pertenciam à mesma linhagem híbrida comercial AG337, proveniente da empresa AGROCERES – PIC, não havendo produção de reprodutores na própria granja.

O manejo reprodutivo da propriedade, que é executado por inseminação artificial, foi mantido para que mudanças na rotina não influenciassem o comportamento e o desempenho reprodutivo dos animais, afetando a fidedignidade dos resultados do experimento.

4.4 Colheita de sêmen e fezes

Os ejaculados dos reprodutores suínos foram obtidos através do consagrado método da mão-enluvada (HANCOCK & HOWELL, 1959), sendo utilizada tanto a fração rica quanto a fração pobre do sêmen.

A fração gelatinosa proveniente das glândulas bulbouretrais foi filtrada em gaze estéril e posteriormente descartada.

O sêmen foi colhido utilizando um copo de vidro graduado, pré-aquecido a 37°C, esterilizado e protegido por um recipiente isotérmico para que a temperatura das amostras fosse mantida, evitando assim a ocorrência de

choque térmico das células espermáticas ao entrarem em contato com o copo coletor.

As amostras de fezes foram colhidas imediatamente após a sua excreção segundo metodologia proposta por Millsbaugh & Washburn (2004) e Touma & Palme (2005).

Pelo ao fato dos esteróides fecais não encontrarem-se uniformemente distribuídos nas bolas fecais (QUEYRAS & CAROSI, 2004), a colheita das amostras foi realizada de forma que várias frações de cada bola fecal do excremento fossem colhidas, desprezando porções da superfície e que estivessem em contato com o piso, minimizando, assim, a contaminação das fezes por bactérias do ambiente.

4.5 Preparação e transporte do material

Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram diluídos na proporção 1:2 (5 mL de sêmen : 10 mL de diluente) em dois diferentes diluentes de refrigeração pré-aquecidos a 37°C, BTS (Beltsville Thawing Solution) e BSUI (BSUI[®], Botupharma[®]).

Logo após, os ejaculados diluídos em BTS e em BSUI foram armazenados e refrigerados em caixa de isopor com gelo seco, na temperatura de 20°C, por um período de até duas horas, visto que este era o tempo necessário para que todos os animais fossem colheitados.

Em seguida, os ejaculados refrigerados foram transportados durante duas horas até o Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, para posterior avaliação.

Desta forma, os ejaculados foram avaliados após terem sido mantidos em refrigeração a 20°C por um período de 3 a 4 horas.

Antes que os ejaculados fossem diluídos, duas alíquotas de sêmen puro de cada um dos animais foram armazenadas em *ependorfs*, identificadas e igualmente transportadas a temperatura de 20°C. Uma destas amostras foi destinada à análise da integridade de membranas dos espermatozóides, da concentração espermática e da morfologia espermática. A segunda alíquota foi

mantida em freezer a -20°C para posterior dosagem dos níveis de sódio, potássio e cálcio no sêmen puro.

Ainda a campo e para a posterior mensuração da concentração de frutose no sêmen dos animais, 0,2 mL de sêmen puro foram adicionados a 1,0 mL de hidróxido de sódio e 1,0 mL de sulfato de zinco. Em 0,2 mL de sêmen puro foram adicionados 1,8 mL de ácido tricloro acético a 10% para mensuração da concentração de ácido cítrico no sêmen. Em seguida, as amostras preparadas para dosagem de frutose e ácido cítrico foram armazenadas em tubos de polipropileno com capacidade para 5,0 mL, identificadas e transportadas a 20°C ao laboratório, juntamente com os ejaculados diluídos e as alíquotas de sêmen puro. No laboratório foram mantidas em freezer a -20°C até o momento das dosagens.

Enquanto o material para posterior dosagem de frutose e ácido cítrico no sêmen era preparado, outras duas alíquotas de 2 mL sêmen puro de cada um dos animais foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 10 minutos para a remoção das células espermáticas. O pellet de espermatozóides obtido com o procedimento de centrifugação foi descartado e o plasma seminal foi armazenado em *ependorfs* identificados e transportados a 20°C até o laboratório, onde foram mantidos em freezer a -20°C para posterior mensuração dos níveis de sódio, potássio e cálcio no plasma seminal dos animais.

O mesmo procedimento realizado com as alíquotas de 0,2 mL de sêmen puro para dosagem de frutose e ácido cítrico foi repetido com alíquotas de 0,2 mL de plasma seminal para possibilitar a dosagem destes elementos no mesmo.

Já o material fecal foi armazenado em sacos plásticos esterilizados e identificados, que foram transportados em uma segunda caixa de isopor com gelo seco a 20°C até o Laboratório de Endocrinologia – UNESP – Botucatu/SP, onde foram mantidos em freezer a -20°C até o momento da extração e dosagem dos metabólitos de cortisol e corticosterona.

4.6 Análise dos parâmetros espermáticos

Assim que os ejaculados diluídos e resfriados a 20°C chegaram da granja, alíquotas de 2 mL foram prontamente reaquecidas a temperatura de 37°C. Em seguida, iniciou-se uma série de procedimentos de avaliação dos seguintes parâmetros espermáticos:

1) Análise da cinética espermática em um analisador computadorizado dos movimentos espermáticos – CASA (HTM-IVOS 10; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA), onde o material previamente homogeneizado foi avaliado depositando uma alíquota de 10µL de sêmen em câmara de Makler (Mackler Counting Chamber[®], Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C, sendo observados cinco campos aleatórios e o número mínimo de 150 espermatozóides por campo. Os parâmetros de movimento espermático avaliados corresponderam a motilidade espermática total (MoT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média do trajeto (VAP, µm/s), velocidade linear (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimento de cauda (BCF, Hz), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e espermatozóides rápidos (RAP, %), que considera apenas células que apresentem VAP acima de 70µm por segundo.

2) Análise da morfologia espermática através da confecção de esfregaços corados pelo método de Karras modificado, descrita por Papa et al. (1988), com contagem de 200 espermatozóides. As anormalidades espermáticas foram classificadas em defeitos maiores e menores (CHENOWETH, 2005).

3) Concentração espermática, que foi realizada através da Câmara de Neubauer, com diluição de 1:19 (sêmen:água destilada).

4) Análise da integridade da membrana plasmática, tanto do sêmen puro, quanto do sêmen diluído em BTS ou BSUI, foi avaliada de acordo com o método descrito por Harrison & Vickers (1990) com os corantes diacetato de carboxifluoresceína (20 mM) e iodeto de propídio (7,3 mM). Foi examinada uma alíquota de 4 µL, entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (Leica[®] - modelo DMLB), em aumento de 1000×. Desta forma, 200 células por

amostra foram avaliadas e classificadas segundo Ortman & Rodriguez-Martinez (1994).

4.7 Protocolo de congelação

O protocolo de congelação do sêmen suíno foi realizado conforme a técnica modificada de Westendorf et al. (1975) e está descrito a seguir. Testes preliminares foram executados nos meses que precederam o experimento, visando definir as curvas de resfriamento, os diluentes de congelação e os crioprotetores que seriam utilizados neste trabalho.

1) As amostras transportadas nos dois diluentes (BTS e BSUI) foram centrifugadas (Centrífuga Excelsa II, modelo 206 MP - Fanem[®]) a 600 x g por 10 minutos para remoção do plasma seminal e concentração dos espermatozóides na forma de *pellets*.

2) Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em dois extensores de congelação: TRIS[®] modificado (Botupharma[®]) e BBB[®] (Botupharma[®]), ambos com 2% de glicerol e 2% de metilformamida como crioprotetores intracelulares.

3) A concentração espermática foi ajustada para 100×10^6 /mL (esta concentração foi adotada com o intuito de viabilizar a utilização do CASA para a avaliação da cinética espermática).

4) Os espermatozóides ressuspensos nos dois diluentes de congelação foram novamente avaliados quanto à cinética espermática e integridade de membranas plasmáticas.

5) As amostras foram então envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico a temperatura ambiente.

6) Posteriormente, as palhetas foram refrigeradas em caixa isotérmica Botutainer[®] (Biotech Botucatu[®]) por 3 horas, a uma curva de resfriamento de 0,1°C/minuto, até alcançarem a temperatura de 15°C.

7) Decorrido este período, as amostras foram refrigeradas em caixa isotérmica Botutainer[®] (Biotech Botucatu[®]) por 4 horas, a uma curva de resfriamento de 0,05°C/minuto, até alcançarem a temperatura de 5°C.

8) Finalmente foi realizada a curva de congelação em caixa de isopor, onde as palhetas foram mantidas a 3 cm do nível do nitrogênio líquido a -120°C por 20 minutos para, em seguida, serem mergulhadas neste, cuja temperatura é de -196°C .

9) Após a congelação das palhetas, as mesmas foram armazenadas em botijão criobiológico até a realização das análises.

4.8 Avaliação do sêmen descongelado

A descongelação das palhetas foi realizada em banho-maria a 46°C por 20 segundos (DELL`AQUA et al., 2001).

Após a descongelação, as palhetas foram mantidas a 37°C por 10 minutos e então a cinética espermática e a integridade de membranas foram novamente avaliadas por um único avaliador conforme descrito no Item 4.6.

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos por meio da análise dos parâmetros seminais, foram considerados três momentos durante a preparação dos ejaculados para a posterior congelação: pré-centrifugação, pós-centrifugação e pós-descongelação.

O momento pré-centrifugação foi aquele onde os ejaculados foram avaliados no laboratório logo após sua chegada, quando já estavam diluídos nos diluentes de refrigeração em BTS e BSUI.

Já o momento pós-centrifugação ocorreu quando os ejaculados foram avaliados após sua centrifugação, eliminação do sobrenadante e posterior ressuspensão dos pellets nos diluentes de congelação TRIS e BBB.

Finalmente, o terceiro e último momento, pós-descongelação, refere-se às análises das características físicas das células espermáticas realizadas após o descongelamento das palhetas.

4.9 Análise das características químicas do sêmen

As dosagens do ácido cítrico e da frutose, tanto no sêmen quanto no plasma seminal, foram efetuadas conforme metodologia proposta por Piva &

Donida (1980) e estão descritas, respectivamente, nos Anexos A e B. A leitura de ambas as amostras foi feita por espectrofotometria (DIASYS® modelo Stardust MC 15).

As quantificações de sódio, potássio e cálcio foram realizadas pelo método de íon seletivo (captação iônica), com leitura realizada no equipamento Iselab (DRAKE®).

Todas as características químicas do sêmen foram avaliadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Botucatu.

4.10 Extração e dosagem das amostras fecais

De acordo com a metodologia proposta por Carlsson et al. (2007), após a descongelação, cinco amostras de aproximadamente 5g de fezes foram selecionadas ao acaso para a análise do conteúdo de cada saco plástico. O conteúdo restante dos sacos foi pesado e completamente misturado, e uma amostra de 5g dessa mistura foi obtida para análise.

Logo após, as amostras fecais foram acondicionadas em recipientes de vidro, armazenadas por 24 horas a uma temperatura de -80°C. Para a liofilização, que foi realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, os recipientes foram abertos, recobertos com papel alumínio perfurado e levados à liofilizadora (Edward do Brasil) à -45°C e pressão de 60 mbar por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram retirados do aparelho, tampadas e mantidas em freezer a -20°C até o momento da realização da extração e dosagem hormonal.

A liofilização das amostras possibilitou a padronização do peso do material fecal utilizado e garantiu a ausência de atividade bacteriana, uma vez que estas necessitam de água para o seu desenvolvimento.

A extração dos metabólitos hormonais foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, de acordo com o protocolo descrito por Graham et al. (2001). Para isto, 0,2g de fezes liofilizadas foram diluídas em 5 mL de etanol a 80% (80% etanol:20% água destilada),

levadas ao vórtex (Phoenix[®] - AP56) em velocidade máxima por 30 segundos para a primeira homogeneização e mantidos em agitador Kline[®] por 12 horas (*overnight*). O extrato foi centrifugado a 1500 x g por 15 minutos (Centrifuga Excelsa II, modelo 206 MP - Fanem[®]), o sobrenadante recuperado em microtubos de polipropileno devidamente identificados e mantido em freezer à -20°C até a realização dos ensaios hormonais.

Ainda no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal, os níveis de metabólitos hormonais de cortisol dos extratos foram quantificados por meio de radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais (Cortisol Coat A – Count[®], fase sólida – Siemens, Los Angeles), seguindo orientações do kit, sendo a leitura realizada pelo aparelho de contagem Gama Counter[®] - Cobra II (Packard BioScience Company).

Por sua vez, no Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo, USP – São Paulo, os metabólitos hormonais de corticosterona foram mensurados também através da técnica de radioimunoensaio (¹²⁵ RIE) duplo anticorpo (GRAHAM et al., 2001), por meio de conjunto diagnóstico comercial (Corticosterone Coat-A-Count[®] - Siemens, Los Angeles). Para esta etapa, as amostras foram diluídas em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000mL), pH 7,0], na proporção de 1/10.

As concentrações de metabólitos de corticosterona determinadas primariamente por RIE foram expressas em ng/mL. Para melhor adequação dos resultados ao extrato fecal do qual ele foi obtido, foi necessária sua conversão para ng/g de fezes secas. Portanto, os resultados obtidos foram transformados pela seguinte equação:

$$CF = \frac{C \times Vfe \times D}{Pi}$$

CF = Concentração final

C = Concentração fornecida pelo RIE

Vfe = Volume de fezes ao final da etapa de extração

D = Diluição empregada

PI = Peso inicial

Foi realizada a validação laboratorial dos conjuntos diagnósticos comerciais para uso em amostras fecais dos reprodutores suínos utilizando-se o método de paralelismo, que indica se o material utilizado está interferindo na ligação antígeno-anticorpo. Para isso, foi realizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva-padrão), nesta amostra adicionamos valores conhecidos dos hormônios estudados a fim de aproximá-los dos pontos da curva-padrão.

4.11 Análise estatística

Para as análises ao longo das estações e entre as estações do ano, tanto da cinética espermática quanto da integridade de membranas e da morfologia espermática, foi efetuada a comparação dos dados através da análise de variância (ANOVA). A mesma análise foi aplicada nas dosagens dos níveis de ácido cítrico, frutose, sódio, potássio e cálcio, tanto no sêmen quanto no plasma seminal, bem como nas dosagens das concentrações de cortisol e corticosterona fecal. Uma vez detectada diferença estatística, ao nível de significância (α) de 5%, foi realizado o teste Tukey para identificar os pares diferentes.

Caso os dados analisados da maneira acima descrita não passassem pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), realizou-se teste de ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis - ANOVA on ranks) seguido, quando necessário, pelo teste de Dunn. Quando comparados somente dois grupos utilizou-se o teste t de Student, também a 5% de significância.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos parâmetros seminais

Quando analisadas as diferenças entre as partidas dentro de cada momento (pré-centrifugação, pós-centrifugação e pós-descongelamento), observou-se uma distribuição não paramétrica nas partidas 1 e 2 (P1 e P2) em alguns meios diluidores e momentos. Os ejaculados dessas partidas foram removidos da análise comparativa, que considerou todas as partidas em conjunto.

5.1.1 Momento pré-centrifugação

O sêmen *in natura* apresentou concentração espermática similar entre as estações, com média e desvio padrão de $221 \pm 112,7$ espermatozoides/mL no inverno e $224 \pm 82,1$ espermatozoides/mL no verão ($p=0,899$). No entanto o volume do ejaculado diferiu estatisticamente entre inverno e verão com valores (média \pm desvio padrão) de $295,1 \pm 67,5$ mL no inverno e de $261,8 \pm 76,0$ mL no verão ($p=0,032$).

A MoT e MP dos espermatozoides, tanto no meio BTS quanto no meio BSUI, encontradas nas diferentes partidas do inverno e do verão, estão representadas, respectivamente, nas Figuras 1 e 2.

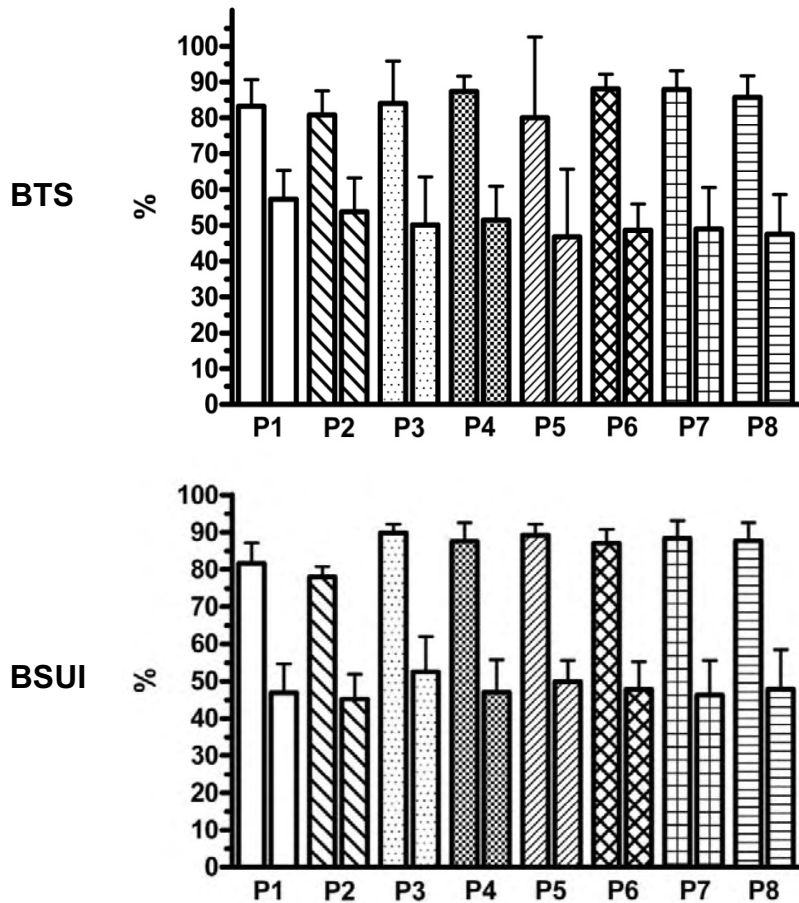


Figura 1: Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) - barras à esquerda e à direita, respectivamente - entre as diferentes partidas (P1 a P8) nos meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI® (BSUI) durante o inverno.

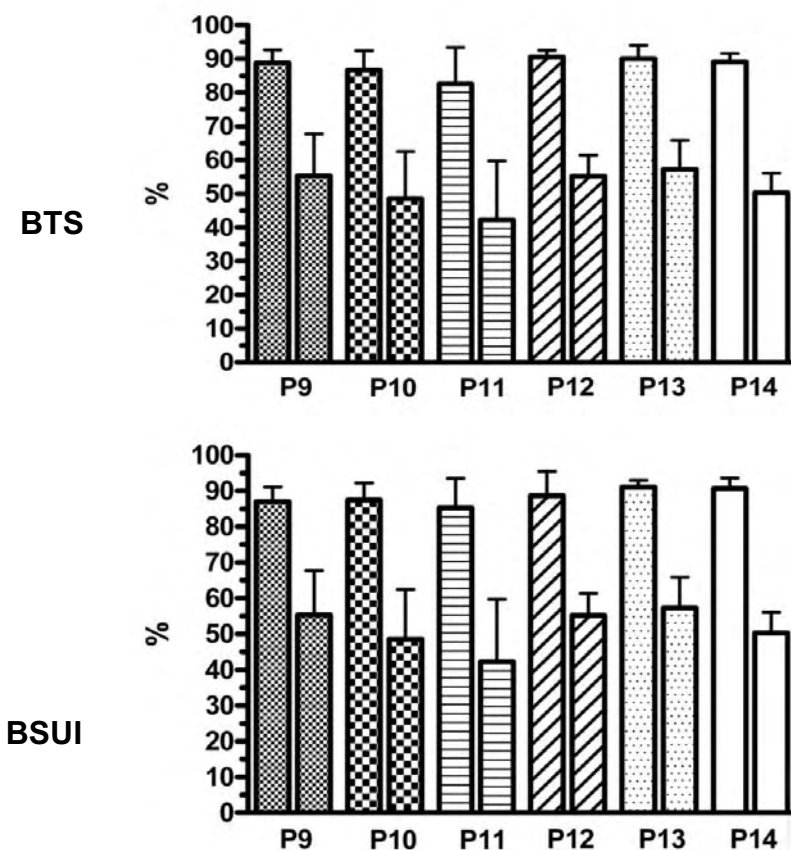


Figura 2: Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) - barras à esquerda e à direita, respectivamente - entre as diferentes partidas (P9 a P14) nos meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI® (BSUI) durante o verão.

No verão não se observou diferenças entre a MoT nas diferentes partidas dentro de um mesmo diluente no sêmen pré-centrifugação, bem como não se observou diferenças entre os valores de MP neste critério.

Quando agrupados os valores das partidas e comparadas as MoT espermáticas entre os meios durante o inverno, os valores obtidos foram $84,7 \pm 9,7\%$ no BTS e $88,3 \pm 4,0\%$ no BSUI ($p=0,030$), demonstrando diferença significativa deste parâmetro entre os diluentes de refrigeração e transporte. O mesmo não ocorreu com a MP, cujos valores no inverno foram de $50,8 \pm 11,2\%$ e $47,9 \pm 8,2\%$ para o BTS e BSUI, respectivamente ($p=0,086$). A Figura 3 representa a MoT e MP entre inverno e verão nos meios BTS e BSUI.

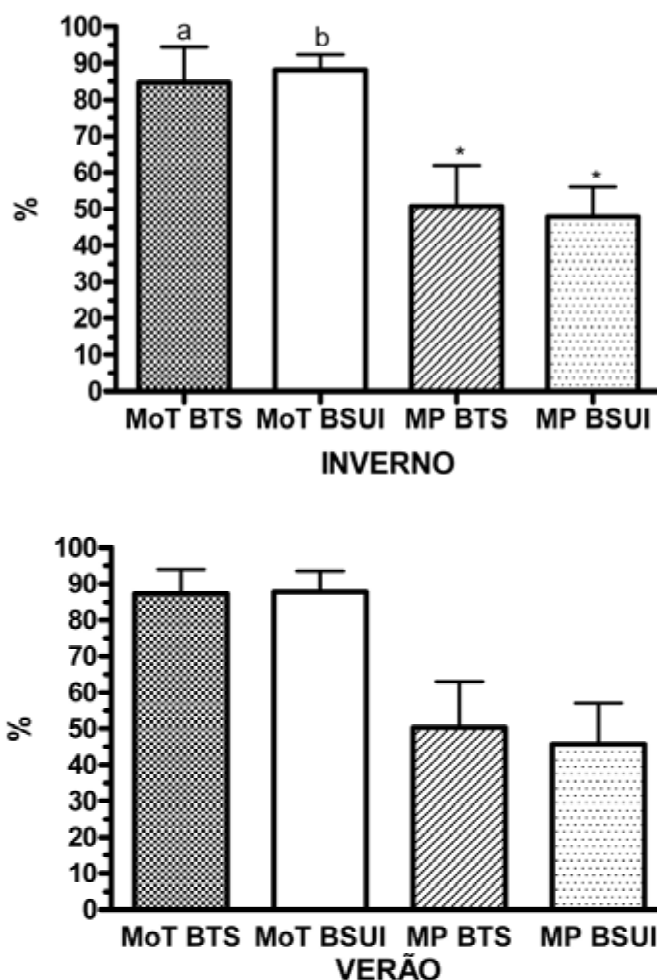


Figura 3: Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) entre inverno e verão nos meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI® (BSUI). (*) indica tendência estatística; letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Já no verão, a MoT no BTS foi de $87,3 \pm 6,6\%$ e de $87,8 \pm 5,7\%$ no BSUI ($p=0,782$). Seguindo mesmo critério, analisando a MP se observou $50,4 \pm 12,8\%$ para o BTS e $45,7 \pm 11,3\%$ para o BSUI ($p=0,139$).

Os resultados combinados e comparados entre os diluentes e as estações inverno e verão no momento pré-centrifugação estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3. As Tabelas 4 e 5 comparam, respectivamente, o diluente BTS e o BSUI entre inverno e verão no momento pré-centrifugação.

Tabela 1: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) do sêmen suíno no momento pré-centrifugação entre os meios Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI® (BSUI), no inverno e verão.

	BTS	BSUI	P
MoT Inverno (%)	84,7 ± 9,7 ^{Aa}	88,3 ± 4,0 ^{Ab}	0,030
MoT Verão (%)	87,3 ± 6,6 ^{Aa}	87,8 ± 5,7 ^{Aa}	0,782
p	0,123	0,665	
MP Inverno (%)	50,8 ± 11,2	47,9 ± 8,2	0,086
MP Verão (%)	50,4 ± 12,8	45,7 ± 11,3	0,139
p	0,870	0,354	

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre as linhas, minúsculas distintas indicam diferenças entre as colunas (p<0,05).

Tabela 2: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os diluentes Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI® (BSUI) no momento pré-centrifugação no inverno.

	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
BTS	99,2±15,8 ^A	73,7±10,9	175,9±29,6 ^A	6,5±0,9 ^A	32,1±3,3	73,6±5,3 ^B	43,3±6,5	80,2±11,6
BSUI	105,9±13,8 ^B	76,8±9,0	189,3±25,8 ^B	6,8±0,8 ^B	31,7±3,4	71,7±4,1 ^A	41,3±4,4	82,4±6,2
p	0,011	0,056	0,006	0,021	0,557	0,021	0,113	0,755

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

Tabela 3: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os diluentes Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI® (BSUI) no momento pré-centrifugação no verão.

	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
BTS	99,9±13,0 ^A	73,4±10,2	180,8±25,7	6,7±1,0	30,4±3,3	72,8±6,0 ^B	45,6±7,3	83,2±7,5
BSUI	107,2±15,1 ^B	75,5±9,8	193,7±25,8	7,0±0,8	29,3±3,6	69,5±5,5 ^A	39,5±4,7	83,9±6,4
p	0,045	0,420	0,058	0,155	0,159	0,028	0,078	0,845

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

Tabela 4: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP do diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) entre inverno e verão no momento pré-centrifugação.

BTS	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
Inverno	99,2±15,8	73,7±10,9	175,9±29,6	6,5±0,9	32,1±3,3 ^B	73,6±5,3	43,3±6,5	80,2±11,6
Verão	99,9±13,0	73,4±10,2	180,8±25,7	6,7±1,0	30,4±3,3 ^A	72,8±6,0	45,6±7,3	83,2±7,5
p	0,833	0,879	0,408	0,246	0,024	0,551	0,131	0,130

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozóides rápidos.

Tabela 5: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP do diluente BSUI® (BSUI) entre inverno e verão no momento pré-centrifugação.

BSUI	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
Inverno	105,9±13,8	76,8±9,0	189,3±25,8	6,8±0,8	31,7±3,4 ^B	71,7±4,1	41,3±4,4	82,4±6,2
Verão	107,2±15,1	75,5±9,8	193,7±25,8	7,0±0,8	29,3±3,6 ^A	69,5±5,5	39,5±4,7	83,9±6,4
p	0,688	0,525	0,436	0,211	0,002	0,057	0,077	0,270

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozóides rápidos.

5.1.2 Momento pós-centrifugação

No momento pós-centrifugação não foram encontradas diferenças significativas na MoT entre os meios dentro de uma mesma estação, conforme demonstrado na Tabela 6.

Os ejaculados diluídos nos meios BTS/TRIS e BSUI/TRIS apresentaram diferença de MoT entre as estações, sendo os valores obtidos com uso de BTS/TRIS no inverno de $87,2 \pm 5,4\%$ e de $83,3 \pm 8,5\%$ no verão ($p=0,030$). Com BSUI/TRIS, os valores foram de MoT foram de $87,5 \pm 4,3\%$ no inverno e de $84,3 \pm 7,7\%$ no verão ($p=0,035$).

Tabela 6: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) no momento pós-centrifugação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Inverno	$87,2 \pm 5,4^b$	$84,7 \pm 9,3$	$87,5 \pm 4,3^b$	$87,7 \pm 5,0$
Verão	$83,3 \pm 8,5^a$	$83,1 \pm 7,5$	$84,3 \pm 7,7^a$	$86,3 \pm 4,7$
p	0,030	0,383	0,036	0,480

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas ($p<0,05$)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

A MP no momento pós-centrifugação não apresentou diferenças estatísticas entre as estações dentro de um mesmo meio, conforme demonstrado na Tabela 7.

As porcentagens de MoT e MP nos diferentes meios de congelamento dentro das estações verão e inverno no momento pós-centrifugação estão expressas na Figura 4. Já os demais parâmetros espermáticos avaliados pelo CASA estão contidos nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 7: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) no momento pós-centrifugação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Inverno	42,3 ± 8,1 ^a	46,1 ± 9,5 ^b	41,0 ± 7,1 ^a	46,2 ± 9,2 ^b
Verão	42,1 ± 10,8 ^{ab}	46,5 ± 9,5 ^b	39,9 ± 9,9 ^a	45,3 ± 9,0 ^{ab}
p	0,920	0,837	0,603	0,646

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas ($p < 0,05$)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

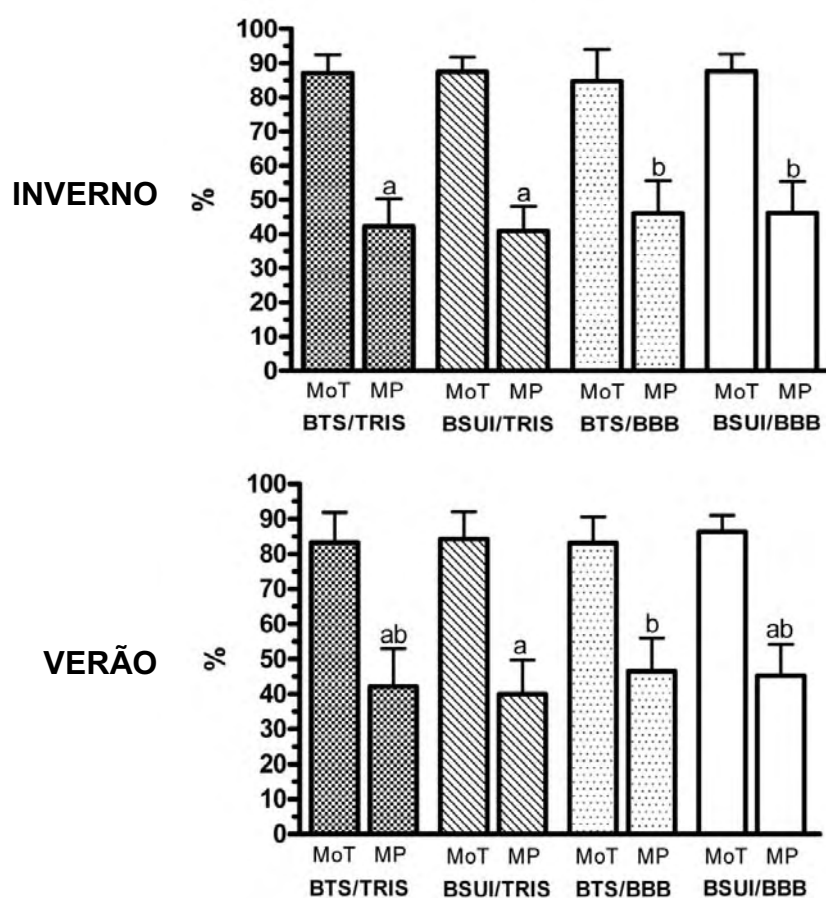


Figura 4: Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP), comparando os meios de congelação BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no inverno e verão no momento pós-centrifugação. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre motilidades progressivas (MP).

Tabela 8: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-centrifugação no inverno.

	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
BTS/TRIS	109,4±11,8 ^{BC}	75,3±7,5	200,6±19,3 ^B	7,6±0,7 ^B	24,8±3,4 ^{AB}	68,3±3,5 ^A	38,3±2,7 ^A	82,9±7,4
BSUI/TRIS	110,4±11,8 ^C	75,3±7,3	201,8±20,3 ^B	7,7±0,6 ^B	23,3±2,9 ^A	67,5±2,8 ^A	38,0±2,2 ^A	83,6±7,1
BTS/BBB	101,8±12,9 ^A	72,4±8,5	185,8±21,4 ^A	7,0±0,7 ^A	27,2±4,1 ^C	70,8±3,4 ^B	39,9±2,8 ^B	81,1±10,9
BSUI/BBB	104,2±10,9 ^{AB}	73,4±7,2	188,8±19,6 ^A	7,2±0,6 ^A	25,6±3,3 ^{BC}	69,9±3,3 ^B	39,6±2,7 ^B	82,5±7,9
p	<0,001	0,066	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,724

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

Tabela 9: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-centrifugação no verão.

	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	RAP
BTS/TRIS	99,9±9,1	69,6±7,3	186,0±14,7 ^{AB}	7,2±0,5 ^{ABC}	25,2±2,7 ^{AB}	68,8±3,4 ^{AB}	41,3±17,9 ^{AB}	80,5±10,1
BSUI/TRIS	99,1±12,5	69,7±6,7	188,1±15,7 ^B	7,4±0,5 ^C	23,7±3,5 ^A	67,3±3,3 ^A	37,8±2,4 ^A	81,9±8,9
BTS/BBB	97,8±9,8	70,3±6,4	177,9±18,3 ^A	6,9±0,6 ^A	27,1±4,0 ^B	71,3±3,6 ^B	40,5±3,1 ^B	80,2±8,4
BSUI/BBB	101,6±10,9	71,7±8,0	182,9±18,2 ^{AB}	7,0±0,6 ^B	25,1±4,5 ^{AB}	69,8±3,5 ^B	40,1±3,1 ^B	83,7±5,2
p	0,298	0,738	0,039	0,003	0,005	<0,001	0,001	0,588

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

5.1.3 Momento pós-descongelamento

A MoT e a MP no momento pós-descongelamento apresentaram diferença estatística entre diluentes apenas no verão, sendo os valores encontrados para estes parâmetros descritos, respectivamente, nas Tabelas 10 e 11.

Nenhum dos diluentes de congelamento apresentou diferença para MoT entre as estações.

Em relação aos valores de MP do sêmen no momento pós-descongelamento, houve diferença significativa entre as estações para os diluentes BTS/TRIS ($23,8 \pm 10,5\%$ no inverno e $30,6 \pm 9,6\%$ no verão, sendo $p=0,002$), BSUI/TRIS ($26,7 \pm 12,6\%$ no inverno e $36,1 \pm 6,3\%$ no verão, sendo $p<0,0001$) e BSUI/BBB ($26,0 \pm 10,6\%$ no inverno e $31,9 \pm 9,2\%$ no verão, sendo $p=0,008$).

A Figura 5 representa as porcentagens de MoT e MP, comparando os diferentes meios dentro das estações verão e inverno no momento pós-descongelamento.

Os demais parâmetros de cinética espermática avaliados pelo CASA neste momento encontram-se nas Tabelas 12 e 13. Na Tabela 14 é possível observar a comparação destes mesmos parâmetros entre os diluentes de congelamento nas duas estações do ano avaliadas.

A comparação entre as porcentagens médias de MoT e MP nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelamento em ambas as estações estão descritas nas Tabelas 15, 16, 17 e 18.

Tabela 10: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) no momento pós-descongelamento entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Inverno	49,5 ± 18,5	55,8 ± 16,7	57,0 ± 16,6	51,8 ± 19,2
Verão	56,2 ± 14,3 ^{ab}	52,4 ± 16,9 ^a	63,3 ± 9,1 ^b	57,9 ± 13,5 ^{ab}
P	0,568	0,373	0,055	0,073

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas ($p<0,05$)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

Tabela 11: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) no momento pós-descongelamento entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno e verão.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Inverno	23,8 ± 10,5 ^A	29,4 ± 10,7	26,7 ± 12,6 ^A	26,0 ± 10,6 ^A
Verão	30,6 ± 9,6 ^{Bab}	28,2 ± 11,0 ^a	36,1 ± 6,3 ^{Bb}	31,9 ± 9,2 ^{Bab}
P	0,002	0,637	<0,0001	0,008

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre as linhas, minúsculas distintas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$).

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

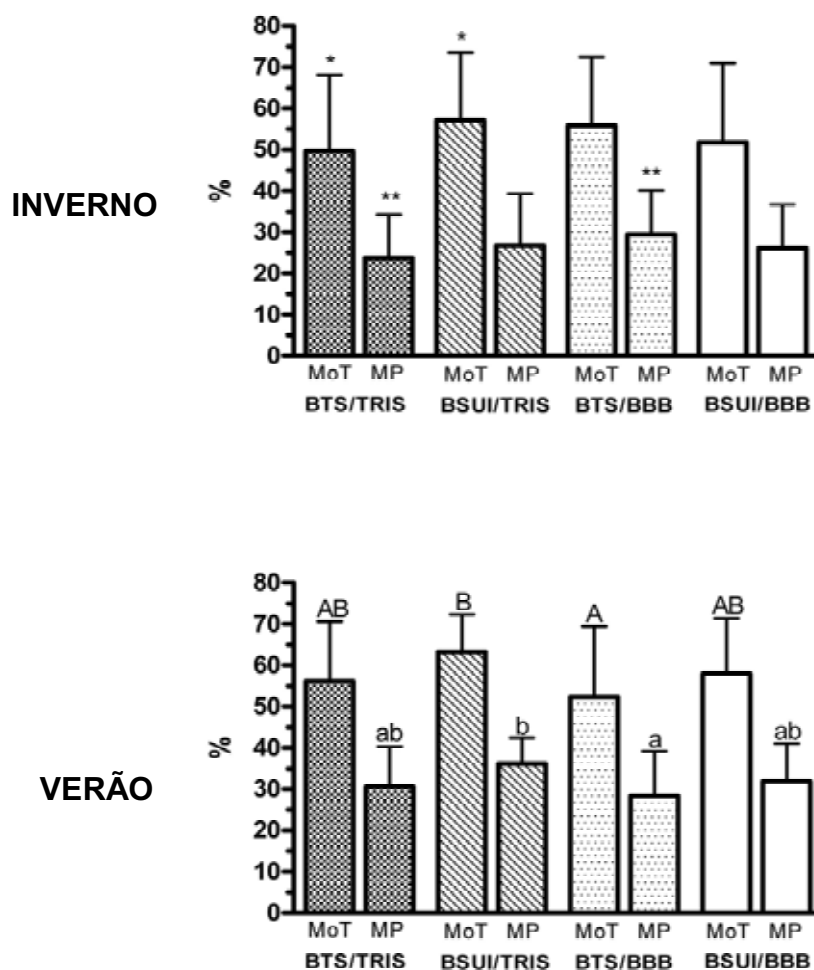


Figura 5: Representação das porcentagens médias e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP), comparando os meios de congelamento BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no inverno e verão no momento pós-descongelamento. (*, **) indicam tendência estatística ($0,10 < p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre motilidade total (MoT) e letras minúsculas distintas entre motilidade progressiva (MP).

Tabela 12: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelação no inverno.

	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
BTS/TRIS	79,7 \pm 9,8	59,2 \pm 14,0	132,5 \pm 17,6	6,1 \pm 0,8	15,9 \pm 4,9 ^A	70,6 \pm 8,8 ^A	45,0 \pm 5,8	43,8 \pm 17,7
BSUI/TRIS	80,0 \pm 10,9	57,7 \pm 8,2	135,3 \pm 19,5	6,2 \pm 0,9	15,3 \pm 4,3 ^A	71,3 \pm 3,9 ^{AB}	43,9 \pm 5,9	47,4 \pm 17,8
BTS/BBB	77,0 \pm 11,0	57,1 \pm 8,2	129,6 \pm 17,6	6,6 \pm 4,1	18,2 \pm 4,8 ^B	73,5 \pm 3,9 ^B	45,3 \pm 5,1	45,2 \pm 19,0
BSUI/BBB	76,7 \pm 10,0	56,7 \pm 7,7	130,5 \pm 15,2	6,2 \pm 0,6	18,3 \pm 4,5 ^B	72,9 \pm 3,2 ^{AB}	44,4 \pm 4,5	45,6 \pm 18,8
p	0,145	0,843	0,255	0,974	<0,001	0,008	0,478	0,710

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas ($p < 0,05$).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®].

Tabela 13: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelação no verão.

	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
BTS/TRIS	78,7 \pm 7,6	60,0 \pm 6,3	119,5 \pm 10,6	5,6 \pm 0,7	11,6 \pm 1,7 ^{AB}	74,6 \pm 2,5 ^A	52,7 \pm 8,4	47,4 \pm 13,6 ^{AB}
BSUI/TRIS	82,0 \pm 9,0	62,6 \pm 7,8	124,9 \pm 11,9	5,5 \pm 1,0	11,1 \pm 2,4 ^A	74,7 \pm 3,1 ^{AB}	50,7 \pm 3,8	54,0 \pm 13,6 ^B
BTS/BBB	76,2 \pm 10,8	59,0 \pm 7,9	115,5 \pm 16,4	5,5 \pm 0,9	12,8 \pm 2,9 ^{AB}	76,4 \pm 2,3 ^B	51,8 \pm 3,1	43,0 \pm 16,9 ^A
BSUI/BBB	79,0 \pm 9,3	60,3 \pm 7,2	122,3 \pm 15,6	5,7 \pm 0,7	13,1 \pm 2,2 ^B	75,3 \pm 2,2 ^{AB}	50,2 \pm 2,9	49,7 \pm 13,7 ^{AB}
p	0,149	0,261	0,058	0,513	0,005	0,033	0,112	0,024

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas ($p < 0,05$).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®].

Tabela 14: Comparação dos valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN e RAP entre os meios BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelamento no inverno x verão.

	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
BTS/TRIS	79,7±9,8	59,2±14,0	132,5±17,6 ^B	6,1±0,8 ^B	15,9±4,9 ^B	70,6±8,8 ^A	45,0±5,8 ^A	43,8±17,7
BTS/TRIS	78,7±7,6	60,0±6,3	119,5±10,6 ^A	5,6±0,7 ^A	11,6±1,7 ^A	74,6±2,5 ^B	52,7±8,4 ^B	47,4±13,6
p	0,584	0,701	<0,001	0,002	<0,0001	0,001	<0,0001	0,280
BSUI/TRIS	80,0±10,9	57,7±8,2 ^A	135,3±19,5 ^B	6,2±0,9 ^B	15,3±4,3 ^B	71,3±3,9 ^A	43,9±5,9 ^A	47,4±17,8 ^A
BSUI/TRIS	82,0±9,0	62,6±7,8 ^B	124,9±11,9 ^A	5,5±1,0 ^A	11,1±2,4 ^A	74,7±3,1 ^B	50,7±3,8 ^B	54,0±13,6 ^B
p	0,354	0,006	0,002	0,002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,049
BTS/BBB	77,0±11,0	57,1±8,2	129,6±17,6 ^B	6,6±4,1 ^B	18,2±4,8 ^B	73,5±3,9 ^A	45,3±5,1 ^A	45,2±19,0
BTS/BBB	76,2±10,8	59,0±7,9	115,5±16,4 ^A	5,5±0,9 ^A	12,8±2,9 ^A	76,4±2,3 ^B	51,8±3,1 ^B	43,0±16,9
p	0,735	0,279	0,0003	0,047	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,585
BSUI/BBB	76,7±10,0	56,7±7,7 ^A	130,5±15,2 ^B	6,2±0,6 ^B	18,3±4,5 ^B	72,9±3,2 ^A	44,4±4,5 ^A	45,6±18,8
BSUI/BBB	79,0±9,3	60,3±7,2 ^B	122,3±15,6 ^A	5,7±0,7 ^A	13,1±2,2 ^A	75,3±2,2 ^B	50,2±2,9 ^B	49,7±13,7
p	0,283	0,027	0,018	0,007	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,228

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas ($p < 0,05$).

VAP = velocidade média do trajeto; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimento de cauda; STR = retilinearidade; LIN = linearidade; RAP = espermatozoides rápidos.

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®].

Tabela 15: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelamento entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno.

Inverno	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Pré-centrifugação	84,7 ± 9,7 ^B	84,7 ± 9,7 ^B	88,3 ± 4,0 ^B	88,3 ± 4,0 ^B
Pós-centrifugação	87,2 ± 5,4 ^B	84,7 ± 9,3 ^B	87,5 ± 4,3 ^B	87,7 ± 5,0 ^B
Pós-descongelamento	49,5 ± 18,5 ^A	55,8 ± 16,7 ^A	57,0 ± 16,6 ^A	51,8 ± 19,2 ^A
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

Tabela 16: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelamento entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no verão.

Verão	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Pré-centrifugação	87,3 ± 6,6 ^B	87,3 ± 6,6 ^B	87,8 ± 5,7 ^B	87,8 ± 5,7 ^B
Pós-centrifugação	83,3 ± 8,5 ^B	83,1 ± 7,5 ^B	84,3 ± 7,7 ^B	86,3 ± 4,7 ^B
Pós-descongelamento	56,2 ± 14,3 ^A	52,4 ± 16,9 ^A	63,3 ± 9,1 ^A	57,9 ± 13,5 ^A
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

Tabela 17: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelamento entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no inverno.

Inverno	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Pré-centrifugação	50,8 ± 11,2 ^C	50,8 ± 11,2 ^C	47,9 ± 8,2 ^C	47,9 ± 8,2 ^B
Pós-centrifugação	42,3 ± 8,1 ^B	46,1 ± 9,5 ^B	41,0 ± 7,1 ^B	46,2 ± 9,2 ^B
Pós-descongelamento	23,8 ± 10,5 ^A	29,4 ± 10,7 ^A	26,7 ± 12,6 ^A	26,0 ± 10,6 ^A
p	<0,001	<0,050	<0,001	<0,001

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

Tabela 18: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP,%) nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no verão.

Verão	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Pré-centrifugação	50,4 ± 12,8 ^C	50,4 ± 12,8 ^B	45,7 ± 11,3 ^B	45,7 ± 11,3 ^B
Pós-centrifugação	42,1 ± 10,8 ^B	46,5 ± 9,5 ^B	39,9 ± 9,9 ^A	45,3 ± 9,0 ^B
Pós-descongelação	30,6 ± 9,6 ^A	28,2 ± 11,0 ^A	36,1 ± 6,3 ^A	31,9 ± 9,2 ^A
p	<0,001	<0,001	<0,010	<0,001

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as linhas (p<0,05)

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

5.1.4 Integridade de membranas

Quando analisada a integridade de membranas plasmáticas no momento pré-centrifugação nos meios BTS e BSUI no inverno não se observou diferença estatística entre os valores, que foram, respectivamente, de 82,9 ± 8,0% e 82,1 ± 7,5% (p=0,520). Durante o verão também não se observou diferença entre os meios, com valores de 81,5 ± 9,2% para o BTS e de 84,0 ± 7,8% para o BSUI (p=0,277).

Quando comparados cada um dos meios entre si nas diferentes estações, também não foi encontrada diferença, sendo o valor de p= 0,446 para BTS e de p=0,247 para o BSUI.

Já no momento pós-descongelação, quando a integridade de membranas foi novamente avaliada, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as estações em nenhum dos diluentes utilizados. Porém, houve diferença entre os diluentes BTS/TRIS e BSUI/BBB dentro de uma mesma estação, tanto no inverno quanto no verão. Os valores de integridade de membranas no momento pós-descongelação estão expressos na Tabela 19.

Tabela 19: Comparação dos valores médios e desvio padrão da integridade de membrana (%) entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB no momento pós-descongelamento no inverno e verão.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB	p
Inverno	37,7±12,3 ^b	34,1±9,9 ^{ab}	35,5±11,8 ^{ab}	30,9±10,3 ^a	0,006
Verão	42,3±12,5 ^b	36,4± 11,1 ^{ab}	37,3±10,2 ^{ab}	31,7±10,3 ^a	0,004
p	0,097	0,324	0,449	0,735	

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas ($p < 0,05$).

BTS = Beltsville Thawing Solution; BSUI = BSUI[®]; TRIS = TRIS[®] modificado; BBB = BBB[®]

5.1.5 Morfologia espermática

Os resultados da análise morfológica do sêmen *in natura* foram compilados na Tabela 20, na qual se agrupou as patologias em defeitos maiores (cabeça/acrossomo, gota proximal, peça intermediária e cauda) e defeitos menores (cabeça, gota distal e implantação da cauda). Não foram encontradas diferenças significativas entre as estações do ano, nem para os defeitos maiores nem para os menores.

A Tabela 21 apresenta a somatória das patologias espermáticas apresentadas pelos animais no inverno e no verão.

Tabela 20: Comparação dos valores médios e desvio padrão das patologias espermáticas (defeitos maiores e menores) do sêmen suíno *in natura* durante o inverno e o verão.

	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	P
Inverno	9,6 ± 8,0 ^b	6,8 ± 7,0 ^a	0,041
Verão	11,1 ± 7,4 ^b	5,4 ± 5,2 ^a	0,001
p	0,362	0,283	

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre as colunas ($p < 0,05$).

Defeitos maiores = gota proximal, peça intermediária, acrossomo e defeitos acentuados em cabeça e cauda.

Defeitos menores = gota distal e defeitos menos acentuados em cabeça e cauda.

Tabela 21: Somatória das patologias espermáticas de todos os animais em cada uma das estações.

	C/A	GP	GD	PI	CI	Cauda	Implantação
Inverno	18	172	256	32	3	144	63
Verão	10	185	156	80	9	104	20

C/A = cabeça/acrossomo; GP = gota proximal; GD = gota distal; PI = peça intermediária; CI = cabeça isolada;

5.1.6 Níveis de sódio, potássio e cálcio

Os níveis médios de sódio no sêmen diferiram entre as estações, sendo significativamente menor no inverno ($106,1 \pm 9,6$ mmol/L) em relação ao verão ($113,8 \pm 7,7$ mmol/L) ($p < 0,001$). Quando comparados os níveis de sódio no sêmen e no plasma seminal, houve diferença estatística apenas no verão, onde os valores médios no sêmen foram de $113,8 \pm 7,7$ mmol/L e no plasma seminal de $108,4 \pm 9,0$ mmol/L ($p = 0,012$).

Os valores de potássio diferiram no sêmen e no plasma seminal em ambas as estações do ano avaliadas, sendo $p = 0,015$ no inverno e $p = 0,015$ no verão.

O cálcio apresentou diferença significativa entre seus níveis no sêmen e no plasma seminal em ambas as estações, bem como entre as estações nos dois materiais analisados.

Os resultados das avaliações de sódio, potássio e cálcio estão demonstrados na Tabela 22.

Tabela 22: Níveis médios e desvio padrão de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{++}) no sêmen e no plasma seminal de suínos durante o inverno e o verão.

	Na^+ sêmen (mmol/L)	Na^+ plasma (mmol/L)	P
Inverno	$106,1 \pm 9,6^A$	$104,5 \pm 10,1$	0,326
Verão	$113,8 \pm 7,7^{Bb}$	$108,4 \pm 9,0^a$	0,012
p	<0,001	0,066	

	K^+ sêmen (mmol/L)	K^+ plasma (mmol/L)	P
Inverno	$17,2 \pm 2,1^b$	$16,2 \pm 2,4^a$	0,015
Verão	$16,9 \pm 2,2^b$	$15,5 \pm 2,1^a$	0,015
p	0,429	0,113	

	Ca^{++} sêmen (mg/dL)	Ca^{++} plasma (mg/dL)	P
Inverno	$0,3 \pm 0,05^{Aa}$	$0,40 \pm 0,08^{Ab}$	<0,001
Verão	$0,4 \pm 0,04^{Ba}$	$0,53 \pm 0,06^{Bb}$	<0,001
p	<0,001	<0,001	

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre as linhas, minúsculas distintas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$).

5.1.7 Concentração de frutose e ácido cítrico

Os valores das concentrações de frutose e ácido cítrico, tanto no sêmen quanto no plasma seminal, encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23: Concentrações médias e desvio padrão de frutose e ácido cítrico no sêmen e no plasma seminal de suínos durante o inverno e o verão.

	Frutose sêmen	Frutose plasma	P
Inverno	36,2 ± 20,4	37,4 ± 19,1	0,730
Verão	35,2 ± 14,9	36,4 ± 22,2	0,984
p	0,813	0,876	

	Ác. cítrico sêmen	Ác. cítrico plasma	P
Inverno	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,5	0,140
Verão	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,6	0,696
p	0,075	0,897	

Não foi encontrada diferença estatística ($p > 0,05$).

5.2 Temperatura e umidade

A média ± desvio padrão da temperatura ambiente foi diferente entre o inverno e o verão sendo, respectivamente, de $19,1 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ e $26,2 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,001$).

A umidade relativa do ar teve média (± desvio padrão) no inverno de $46,0 \pm 3,9\%$. e de $81,7 \pm 3,2\%$ no verão ($p < 0,001$).

Os valores semanais de temperatura e umidade estão representados na Figura 6.

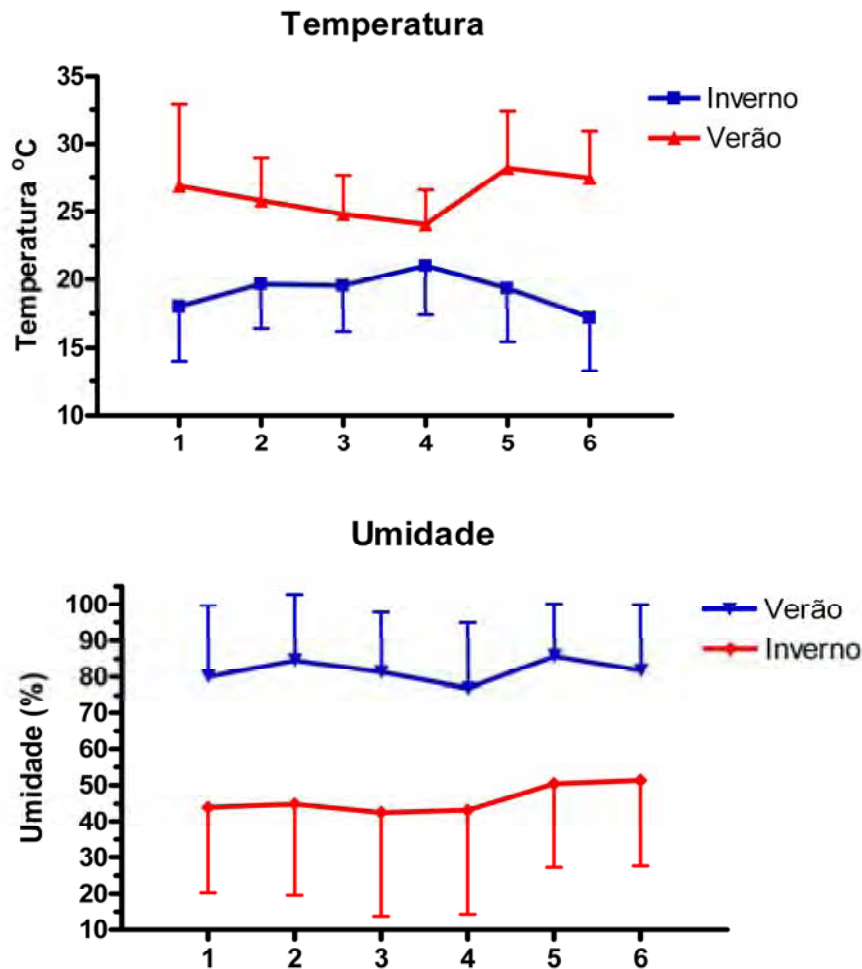


Figura 6: Apresentação semanal dos dados de temperatura e umidade durante o inverno e verão.

5.3 Glicocorticóides

As concentrações fecais de cortisol, quando comparadas entre o inverno e o verão, não demonstraram diferença estatística ($p=0,251$), sendo encontrados os valores (média \pm erro padrão da média) de $1,1 \pm 0,03 \mu\text{g/dL}$ para o inverno e de $1,1 \pm 0,04 \mu\text{g/dL}$ para o verão.

Já as concentrações fecais de corticosterona, quando comparadas, mostraram diferença significativa entre as estações avaliadas, sendo as concentrações (média \pm erro padrão da média) encontradas no inverno ($14933,4 \pm 772,3 \text{ ng/g}$ de fezes secas) inferiores aquelas encontradas durante o verão ($19172,5 \pm 909,1 \text{ ng/g}$ de fezes secas) ($p<0,001$).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As concentrações espermáticas médias encontradas neste trabalho não diferiram entre as estações, porém o volume seminal foi, em média, 20% maior durante o inverno. Isto demonstra que o número de células espermáticas totais contidas nos ejaculados do inverno foi proporcionalmente superior ao encontrado no verão. Este resultado está de acordo com o obtido por Trudeau & Sanford (1986), Ciereszko et al. (2000) e Smital (2009), que afirmaram que o número total de espermatozóides do ejaculado suíno foi maior durante o outono e inverno do que na primavera e verão. Kozdrowski & Dubiel (2004) também encontraram maior volume e número de espermatozóides totais durante o final do outono em trabalho realizado com suínos selvagens.

Quando os dados das amostras de sêmen *in natura* pós-transporte foram analisados estatisticamente, tornou-se necessário remover as partidas 1 e 2 devido à variação residual e distribuição fora do esperado apresentadas pelas mesmas. Isto pode ser explicado pelo fato de que estas partidas foram as primeiras a serem colhidas, quando os ajustes finais dos procedimentos de colheita ainda estavam sendo realizados. Desta forma, obteve-se maior homogeneidade entre os resultados e também entre as partidas, visto que foi padronizado um mesmo número de partidas (seis) para cada uma das estações avaliadas.

No momento pré-centrifugação, quando os ejaculados diluídos nos meios BTS e BSUI foram avaliados logo após o transporte, a MoT do diluente BSUI foi maior do que do BTS durante o inverno, porém houve uma tendência da MP do diluente BTS ser maior nesta mesma estação. Desta forma, a despeito das diferenças e tendências encontradas pela análise estatística, podemos notar que os valores percentuais de ambos os parâmetros seminais entre os diluentes de refrigeração são muito semelhantes, demonstrando que na prática o desempenho de ambos foi muito próximo. Apesar disto, os ejaculados que foram acrescidos ao diluente BSUI apresentaram uma menor variabilidade em todos os momentos avaliados, o que representa um importante aspecto a favor deste meio.

Segundo Hirai et al. (2001), a MoT é um parâmetro preditivo de fertilidade importante em suínos. Os autores relatam que ejaculados de suínos capazes de gerar leitegadas com mais de 10 leitões possuem cerca de 93% de MoT, enquanto ejaculados que geram leitegadas de menor tamanho, a MoT registrada foi em torno de 80%.

Ainda no momento que antecedeu a centrifugação, a velocidade média da trajetória (VAP) e a velocidade curvilinear (VCL) foram significativamente superiores no diluente BSUI durante o inverno. Já no verão, apenas a VAP foi superior no meio BSUI, havendo uma tendência para que o mesmo ocorresse com a variável VCL. Parâmetros de cinética espermática como MoT, VCL, VAP e velocidade linear progressiva (VSL) são usados para diferenciar os padrões do movimento espermático (MORTIMER, 2000). Segundo Versteegen et al. (2002), a VAP, a VCL e a VSL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócitos é menor que 50%. Entretanto, entre os parâmetros cinéticos fornecidos pelo o CASA, a VCL e a amplitude lateral de cabeça (ALH) têm mostrado grande correlação com taxa de fertilização pela maioria dos estudos. Parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos, mas correlação negativa em outros (VERSTEGEN et al., 2002).

O exame de integridade de membranas no momento pré-centrifugação, bem como a análise da morfologia espermática, também não demonstrou diferenças significativas entre as estações. Estes resultados provavelmente se devem ao fato de que os animais, que já se encontravam alojados nas baias onde foram mantidos durante todo o período da colheita de dados, estão adaptados ao ambiente onde vivem. Resultados diferentes foram obtidos por Suriyasomboon (2005) e Malmgren (1988), que notaram maiores quantidades de células espermáticas com anormalidades de cabeça e com gota protoplasmática proximal (defeitos maiores) durante o verão.

No momento pós-centrifugação os diluentes BTS/TRIS e BSUI/TRIS apresentaram MoT superior no inverno em relação ao verão, não tendo o mesmo ocorrido com a MP, que foi superior nos meios BTS/BBB e BSUI/BBB durante o inverno. Porém, assim como ocorreu no momento pré-centrifugação, os valores percentuais de ambos os parâmetros foram muito próximos em

todos os diluentes avaliados. No verão, a MP obtida com uso de BTS/BBB foi superior àquela obtida com o uso de BSUI/TRIS e, inversamente, a variável VCL, em oposição com o ocorrido com a MP, foi superior no BSUI/TRIS em relação ao BTS/BBB. Durante o inverno os parâmetros VAP, VCL, ALH e BCF foram superiores no meio BSUI/TRIS quando comparado ao BTS/BBB. Estes resultados demonstram uma ligeira superioridade dos meios que empregaram o uso do TRIS em detrimento ao BBB.

Nenhum dos meios de congelação testados apresentou diferença de MoT entre as estações avaliadas no momento pós-descongelação. Já em relação à MP, os diluentes BTS/TRIS, BSUI/TRIS e BSUI/BBB apresentaram valores médios mais elevados durante o verão. Estes dados, reforçados pela ausência de diferença entre as estações, tanto na integridade de membranas avaliada após a descongelação do sêmen quanto na morfologia espermática, corroboram com a adaptação dos animais ao meio ambiente.

Provavelmente, o fato de que os animais já se encontravam alojados nas mesmas baias em que foram mantidos durante todo o experimento, juntamente com a adaptação dos mesmos ao clima local, visto que foram criados nesta mesma granja, fizeram com que estes cachacos não demonstrassem uma queda da qualidade seminal nos meses mais quentes do ano. Outro fator que pode ter contribuído para isto se deve ao uso de ventilação artificial no galpão de alojamento dos animais nos dias mais quentes de verão. Segundo Moura (1999), a ventilação artificial não é capaz, por si só, de reduzir a temperatura ambiente, porém traz aos animais a sensação de conforto térmico.

Nos ejaculados descongelados, as variáveis MoT, MP e espermatozóides rápidos (RAP) foram superiores no diluente BSUI/TRIS em relação ao BTS/BBB durante o verão. Já a integridade de membranas do meio BTS/TRIS foi maior que a do BSUI/BBB. Estes valores demonstram que as associações contendo o diluente de congelação TRIS foram capazes de preservar melhor a cinética e a integridade das membranas espermáticas durante o processo de congelação em relação ao uso do diluente BBB, mantendo, assim, os resultados obtidos até o momento pós-centrifugação.

Bianchi (2007) relatou maiores índices de motilidade total (MoT) com o uso do BTS em relação a dois outros meios de refrigeração testados, tanto após a refrigeração quanto após a descongelação dos ejaculado.

Apesar de alguns autores, como Almlid & Johson (1988), Holt (2000) e Watson (2000), afirmarem que o glicerol possui um potencial efeito citotóxico à célula espermática, a combinação de crioprotetores utilizada neste trabalho não conferiu tal efeito de toxicidade aos espermatozóides, fato este que pôde ser observado pelos índices satisfatórios de motilidade alcançados após a descongelação. Estes resultados podem ser atribuídos à associação da metilformamida ao glicerol e à porcentagem utilizada de ambos os crioprotetores (2%). Ball & Vo (2001) relatam que as amidas possuem ma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula de água, desempenhando um mecanismo protetor celular mais eficiente que o glicerol. Bianchi (2007) observou a falta de trabalhos testando este crioprotetor no sêmen suíno.

A despeito dos efeitos climáticos e dos diferentes diluentes utilizados neste trabalho, a técnica e a associação de crioprotetores utilizadas no processo de congelação do sêmen conferiram resultados de motilidade espermática inéditos e superiores aos encontrados atualmente na literatura. Spencer et al. (2010) obtiveram MoT média de 38% com uso de sêmen descongelado de suínos, valor este semelhante ao encontrado por Ramos (2004), cujo estudo descreve valores entre 37 e 46%, por Calderam et al. (2005) e Fraser & Strzezek (2007), que relatam médias de 43%, e por Oberlender (2010) , com médias descritas de 35% de MoT no sêmen suíno descongelado. Alguns dos fatores que podem ter contribuído com os índices de viabilidade espermática do sêmen descongelado obtidos neste trabalho são a alta qualidade do material genético dos animais utilizados e o manejo diferenciado preconizado pela granja, cuja assistência técnica de um médico veterinário responsável pelo desempenho reprodutivo dos cachacos assegurou uma boa qualidade seminal. Além disso, o período de refrigeração sofrido pelos ejaculados antes e durante o transporte podem ter ocasionado efeitos benéficos aos espermatozóides, agindo como um período de equilíbrio.

A ausência de variação das concentrações de frutose e ácido cítrico entre o inverno e o verão que ocorreu neste trabalho indica, de acordo com

Mann (1948) e Filippini et al. (2001), que a função secretora das vesículas seminais e da próstata, respectivamente, não foram afetadas pelo aumento da temperatura e umidade e umidade relativa do ar. Estes resultados são contrários aos descritos por Humphrey & Mann (1949), que descreveram maiores concentrações destas substâncias no sêmen de carneiros durante as estações outono e inverno.

Os autores Humphrey & Mann (1949), Hupp et al. (1961) e Piva & Donida (1980) afirmam que a produção e a manutenção do ácido cítrico e da frutose no sêmen são reguladas diretamente pela produção testicular de testosterona. Desta forma, podemos também inferir que a produção testicular de testosterona não foi afetada pelos fatores climáticos a ponto de refletir nas concentrações de frutose e de ácido cítrico.

No presente trabalho, os níveis de potássio seminal não diferiram de acordo com a estação avaliada, bem como a MoT dos ejaculados avaliados no momento pré-centrifugação. Estes resultados confirmam a constatação proposta pelos autores. Dott & White (1964), que relataram que os níveis de potássio intracelular estão diretamente relacionados com a motilidade espermática no sêmen de carneiros.

Os níveis de potássio no sêmen foram superiores às encontradas no plasma seminal, fato este que coincide com o trabalho de Cragle et al. (1958) realizado com bovinos, que demonstraram que o nível de potássio é mais elevado no interior da célula espermática do que no plasma seminal.

Os dados obtidos com as dosagens dos níveis de sódio e cálcio no presente estudo demonstraram níveis de cálcio mais elevados no plasma seminal em relação ao sêmen. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Cragle et al. (1958), que relataram que, inversamente ao que ocorre com o potássio, sódio e cálcio apresentam maiores níveis no plasma seminal. Porém, durante o verão, os níveis de sódio foram superiores no sêmen. Esta diferença pode ser atribuída pela espécie estudada. Na presente revisão não foram encontrados trabalhos que demonstrem a diferença dos níveis destes elementos entre sêmen e plasma seminal de suínos.

Os maiores níveis de sódio e cálcio encontrados no sêmen durante o verão podem ser explicadas pelo menor volume seminal que ocorre neste

mesmo período. Em menores volumes estes elementos tornam-se proporcionalmente mais concentrados.

As temperaturas e umidade relativa do ar mais elevadas durante o verão em relação ao inverno já eram esperadas. O Brasil é um país de clima predominantemente tropical e os meses de outubro a março são marcados por temperaturas elevadas e alta incidência de chuvas (INMET, 2011).

No local onde os animais encontravam-se alojados durante a colheita de dados, nos meses de janeiro e fevereiro as médias de temperatura e umidade relativa do ar ultrapassaram os limites desejáveis, alcançando valores de 26,2°C e 82,2%, respectivamente. A temperatura recomendada para suínos em fase de reprodução é de 18 a 22°C (SCHEID & SILVEIRA, 2002) e a umidade relativa do ar de 50 a 70% (MOURA, 1999).

Diversos autores têm relatado a influência das temperaturas elevadas sobre os parâmetros seminais dos reprodutores suínos (CAMERON & BLACKSHAW, 1980; MYER & BUCKLIN, 2001; SCHEID & SILVEIRA, 2002; KUNAVONGKRIT et al., 2005; YANG et al., 2010). Kunavongkrit et al. (2005) correlacionaram o estresse causado pelas altas temperaturas ambientais com a diminuição do volume seminal e da concentração espermática, atribuindo esta relação à produção excessiva de hormônios corticosteróides ocasionada pelo estresse.

Embora o cortisol seja o principal glicocorticóide produzido e excretado pelos suínos (JUNIEWICZ & JOHNSON, 1981), também há produção de corticosterona, sendo estes os principais hormônios envolvidos na resposta a estímulos estressantes (BROOM & JOHNSON, 1993; apud QUEYRAS & CAROSI, 2004).

Apesar de alguns autores demonstrarem que, sob altas temperaturas, na fase aguda do estresse térmico, ocorra uma elevação da concentração plasmática de cortisol (RUCKEBUSCH et al., 1991; MCFARLANE et al., 1995, MÖSTL & PALME, 2002), e que após 48 horas a mesma irá se refletir nas quantidades de metabólitos hormonais de cortisol excretados pelas fezes (PALME et al., 1996; MORMÈDE et al., 2007), as concentrações de metabólitos de cortisol obtidas pelas fezes não demonstraram nenhuma diferença entre as estações do ano avaliadas, a despeito das marcadas variações de temperatura e umidade do ambiente.

Estes resultados são condizentes aos obtidos por Kunavongkrit et al. (2005), que afirmaram que os suínos geralmente são muito bem adaptados ao meio ambiente e, quando se encontram em instalações com temperaturas elevadas, há um rápido aumento do cortisol plasmático, mas nas 72 horas seguintes retornam praticamente aos níveis normais, o que indica a adaptação dos suínos às diversas temperaturas ambiente.

Os metabólitos hormonais de corticosterona, apesar de serem os principais glicocorticóides encontrados nas fezes de aves e roedores, estão em quantidades menos significativas nas fezes de suínos (PALME et al., 2005). Por este motivo, apesar das concentrações de metabólitos hormonais de corticosterona terem sido maiores nas fezes dos reprodutores do experimento durante o verão, a ausência desta mesma diferença em relação ao cortisol, que é o principal glicocorticóide encontrado em amostras fecais de suínos, demonstra que os animais encontravam-se adaptados ao ambiente.

Amostras fecais foi o material escolhido para a mensuração indireta destes hormônios, pois, apesar de grande parte da excreção de cortisol em suínos ocorrer pela urina (PALME et al., 1996), a obtenção destas amostras, bem como ocorre com amostras de sangue, requer a contenção e até mesmo a manipulação do animal, o que interfere nos resultados obtidos causando um aumento imediato nos níveis deste glicocorticóide (MORMÈDE et al., 2007; PALME et al., 1996). Outra justificativa para o emprego deste tipo de abordagem é o fato dos dados obtidos representarem a atividade secretora de uma determinada glândula durante certo tempo, ao invés de episódios isolados como no caso das dosagens sanguíneas (MORAIS, 1999; HOPSTER et al., 1999) ou de urina (MÖSTL & PALME, 2002). Além disso, a análise da concentração do cortisol nas fezes é um método não-invasivo, confiável e de baixo nível de dificuldade (CARLSSON et al., 2007; QUEYRAS & CAROSI, 2004).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos e dos resultados obtidos sob as condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que:

✓ O número de células espermáticas totais e o volume do ejaculado *in natura* são superiores no inverno em relação ao verão.

✓ Os parâmetros de integridade de membranas, morfologia e cinética espermática nos momentos que antecederam a congelação não são influenciados, de forma geral, pela estação do ano.

✓ Os níveis de sódio no sêmen e de cálcio no plasma seminal são mais elevados no verão do que no inverno.

✓ A metodologia de congelação aplicada e os meios utilizados mostraram índices de congelabilidade satisfatórios.

✓ A motilidade progressiva pós-descongelação, de forma geral, é melhor no verão do que no inverno.

✓ O diluente de congelação TRIS foi capaz de conferir uma melhor estabilidade para as variáveis de cinética espermática e de integridade de membranas do que o meio BBB.

✓ A corticosterona é influenciada pela estação do ano.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; FRASER, L.R. A biphasic pattern of Ca^{++} uptake by mouse spermatozoa *in vitro* correlates with changing function potential. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.187-194. 1993.

ALMLID, T.; JOHNSON, L.A. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2899-2905. 1988.

ANDRADE, A.F.C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de quinos**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 132f. 2009.

ANTUNES, R.C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.60-63. 2007.

ARNOULT, C.; KAZAM, I.G.; VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S.; VILLAZ, M.; FLORMAN, H.M. Controlo f the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. **Proceedings of the National Academy Science**, USA, v.96, p.6757-6762, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE A INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA (ABIPECS). Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>. Acesso em: 24 de outubro de 2010.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069. 2001.

BECKER, B.A.; NIENABER, J.A.; DESHAZER, J.A.; HAHN, G.L. Effect of transportation on cortisol concentrations and on the circadian rhythm of cortisol in gilts. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1457-1459. 1985.

BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Emprego de sêmen congelado na IA de suínos. In: BORTOLOZZO, F.P. et al. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 185 p. 2005.

BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; CALDERAM, K.; LUCIA, T.J.; CORRÊA, E.K.; PANZARDI, A.; ULGUIM, R.R.; PERONDI, A.; DESCHAMPS, J.C. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com diferentes tempos de estabilização pré-congelamento. In: **Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica – VII ENPOS – UFPel**, Pelotas, Brasil. 2005.

BIANCHI, I. **Congelação de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extra celulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, RS, 95p. 2007.

BOLARÍN, A.; HERNÁNDEZ, M.; VAZQUEZ, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Use of frozen-thawed semen aggravates the summer-autumn infertility of artificially inseminated weaned sows in the Mediterranean region. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3967-3975. 2009.

BORGHETTI, P.; DE ANGELIS, E.; SALERI, R. Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: Relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL), and cortisol changes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.110, p.17-25. 2006.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Situação da IA em suínos no Brasil e no mundo. In: BORTOLOZZO, F.P. et al. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada.** Porto Alegre: Pallotti, 185 p. 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33(1):17-32. 2005.

BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.31, p.224-238. 1994.

CALDERAM, K.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T.; CORRÊA, E.K.; PIASSI, L.M.; ULGUIM, R.R.; MADEIRA, E.M.; DESCHAMPS, J.C. Motilidade de sêmen suíno descongelado com o uso de diferentes crioprotetores. **Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica – VII ENPOS – UFPel**, Pelotas, Brasil. 2005.

CAMERON, R.D.A.; BLACKSHAW, A.W. The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis in the boar. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.59, p.173–179. 1980.

CARLSSON, H.E.; LYBERG, K.; ROYO, F.; HAU, J. Quantification of stress sensitive markers in single fecal samples do not accurately predict excretion of these in the pig. **Research in Veterinary Science**, v.82, p.423-428. 2007.

CHENOWETH, O.J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v.64, p.457-468. 2005.

CIERESZKO, A.; OTTOBRE, J. S.; GLOGOWSKI, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. **Animal Reproduction Science**. v.64, p. 89-96. 2000.

CÓRDOVA, A.; DUCOLOMB, Y.; JIMÉNEZ, I.; CASAS, E.; BONILLA, E.; BETANCOURT, M. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar sêmen. **Theriogenology**, v.47, p.1309-1317. 1997.

CRABO, B.G.; ZIMMERMAN, K.J.; MOORE, R.; THORNBURGH, F.H. Movement of sodium and potassium into ejaculated boar spermatozoa suspended in seminal plasma and a biological salt solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.444, p.875-885. 1976.

CRAGLE, R.G.; SALISBURY, G.W.; VAN DEMARK, N.L. Sodium, potassium, calcium and chloride distribution in bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.41, p.1267-1272. 1958.

CURTIS, S.E. **Environmental Management in Animal Agriculture**. Iowa State Univ. Press, Ames, p. 97-122. 1983.

DELL`AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.344-346. 2001.

DICKSON, W.M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M.J. & REECE, W.O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 856p. 1996.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.49, p.451-461. 1995.

DOTT, H.M.; WHITE, I.G. Effect of potassium on ram spermatozoa studied by a flow dialysis technique. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.7, p.127-138. 1964

DUBÉ, C.; TARDIF, S.; LECLERC, P.; BAILEY, J.L. The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during in vitro capacitation. **Journal of Andrology**, v.24, p.727-733, 2003.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Anatomia Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 663p., 1997.

ESTIENNE, M. J. Keep boars cool during summer. **Livestock Update**. Virginia Cooperative Extension. 2000.

FILIPPINI, C.A.F.; ROPELATTO, C.; SILVA, A.S.; BIANCHINI, E.; THIESEN, K.; TENCONI, P.; HAAS, P. Infertilidade Masculina. **Revista Newslab**, v.44, p.114-130. 2001.

FLESCH, F.M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.M.; GADELLA, B.M. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.262, p.787-792. 1999.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235. 2000.

FLOWERS, W.L. Reproductive management: a technical and economical analysis of natural mating (NM) versus artificial insemination (AI). In: **Anais do VII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Blumenau, Brasil. 1995.

FRASER, L.; STRZEZEKJ. Effect of different procedures of ejaculate collection. Extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.317-329. 2007.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BEVERS, M.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; NEILD, D.; COLENBRANDER, B. The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n.5, p.24. 2001.

GRAHAN, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progesterones in feces and serum. **Zoo Biology**, v.20, p.227-236. 2001.

GROSSFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v. 70, p. 1225-1233. 2008.

HANCOCK, J.L.; HOWELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665. 1959.

HANNAS, M.I. **Aspectos fisiológicos e a produção de suínos em clima quente**. In: SILVA, I.J.O. **Ambiência e qualidade na produção industrial de suínos**. 1. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 1-33.1999.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-52, 1990.

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A.; WOLF, E.; FOLL, J.; AUMULLER, R.; BRAUM, J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, v.22, p.104-110, 2001.

HOFMO, P.O.; ALMLID, T. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.1, p.111-112. 1991.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22. 2000.

HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v.63, p.370-382. 2005.

HOOD, R.D.; FOLEY, C.W.; MARTIN, T.G. Effects of cold shock, dilution, glycerol and dimethyl sulfoxide on cation concentrations in porcine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.30, p.91-94. 1970.

HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J.T.N.; ERKENS, J.H.F.; BLOKHUIS, H.J. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.77, p.708-714. 1999.

HUMPHREY, G.F.; MANN, T. Studies on the metabolism of semen. **Biochemical Journal**, v.44, p.97-105. 1949.

HUPP, E.W.; ANDREWS, J.F.; MURPHREE, R.L. Effect of exogenous testosterone on fructose and citric acid of swine semen. **Journal of Animal Science**, v.20, p.774-777. 1961.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br> . Acesso em: 23 de maio de 2011.

JOHNSON, L.A.; Fertility results using frozen boar spermatozoa. In: Proceedings of the 1st international conference on deep freezing of boar semen, p. 199-222. 1985.

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

JUNIEWICZ, P.E.; JOHNSON, B.H. Influence of adrenal steroids upon testosterone secretion by boar testis. **Biology of Reproduction**, v.25, p.725-733, 1981.

KOZDROWSKI, R.; DUBIEL, A. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa L.*) semen. **Animal Reproduction Science**. v.80, p. 281-289. 2004.

KUNAVONGKRIT, A.; SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; HEARD, T.W.; EINARSSON, S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v.63, p.657-667. 2005.

KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-Cell™ extenders. **Theriogenology**, v.52, p. 365-376. 1999.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; GRAHAM, J.K.; ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during *in vitro* capacitation. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.96-105. 2004.

MALMGREN, L. **Experimentally induced testicular alteration in boars**. Tese (Doutorado), Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Suécia, 20p. 1988.

MANN, T. Fructose content and fructolysis in semen: Practical application in the evolution of semen quality. **Journal of Agricultural Science**, v. 38, p. 322-331. 1948.

MANN, T. **The biochemistry of semen**. In: John Wiley and Sons, Inc, New York, NY. 159p.1954.

MANN, T. Male sex hormone and its role in reproduction. **Rec Prog Horm Res**, v.12, p.353. 1956.

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.L.; DAY, B.N. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, v.122, p.289-296. 2001.

MARTINS, N.O.; CORCINI, C.D.; CORREA, M.N.; MADEIRA, M.P.; PERONDI, A.; COREZZOLLA, J.L. Métodos de congelamento para sêmen suíno e seus efeitos na motilidade espermática. In: **Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica – VII ENPOS – UFPel**, Pelotas, Brasil. 2005.

MCFARLANE, A.; COGHLAN, J.; TRESHAM, J.; WINTOUR, E.M. Corticotropin-releasing factor alone, but not arginine vasopressin alone, stimulates the release of adrenocorticotropin in the conscious intact sheep. **Endocrinology**, v.136, n.5, p.1821-1827. 1995.

MCNITT, J.L.; TANNER, C.B.; FIRST, N.L. Thermoregulation in the scrotal system of the boar. II. Evaporative heat exchange. **Journal of Animal Science**, v.34, p.117–121. 1972.

MILLSPAUGH, J.J.; WASHBURN, B.E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v.138, p.189-199. 2004.

MORAIS, R.N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (Leopardus pardalis, Leopardus wiedii e Leopardus tigrinus) sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais**. 1999. 177f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; REENEN, C.G.V.; RICHARD, S.; VEISSER, I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v.92, p.317-339. 2007.

MORTIMER, S.T. Casa – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v.4, p.515-524. 2000.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74. 2002.

MOURA, D.J. **Ventilação na suinocultura**. In: SILVA, I.J.O. **Ambiência e qualidade na produção industrial de suínos**, 1 ed. Piracicaba: FEALQ, p.149-179. 1999.

MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.I. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. **Endocrine Reviews**, v.5, p.25-44. 1984.

MYER, R.; BUCKLIN, R. Influence of hot-humid environment on growth performance and reproduction of swine. AN107. Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2001.

NAZKI, A. R.; RATTAN, P.J. S. Some hormonal and biochemical characteristics of blood in sheep as related to different seasonal environments. **Indian Veterinary Journal**, v. 68, p.28-32. 1991.

OBERLENDER, G.; ZANGERONIMO, M.G.; MURGAS, L.D.S.; ROCHA, L.G.P.; PEREIRA, B.A.; SILVA, D.M. Qualidade espermática do sêmen suíno após o congelamento por diferentes métodos. **XIX Congresso de Pós-Graduação da UFPA**, Lavras, Brasil, 2010.

OHATA, P.M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M.L.; CASTAGNA, C.; BORTOLOZZO, F.P. Viabilidade do sêmen suíno congelado submetido a um período de equilíbrio pré-congelamento com ou sem a presença de plasma seminal. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, 29(2), p.123-129. 2001.

OHATA, P.M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M.L.; CASTAGNA, C.D.; BORTOLOZZO, F.P. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.69-74. 2005.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa package in plastic bags. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47. 1994.

PALME, R.; FISCHER, P.; P. SCHILDORFER, H., ISMAIL, M.N., Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.43-63. 1996.

PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S.M.; MÖSTL, E. Stress hormones in mammals and birds – Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1040, p.162-171. 2005.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M.; BICUDO, S.D.; RAMIRES, P.R.N.; LOPES, M.D. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.40, p.115-123. 1988.

PAQUIGNON, M. Influence of season on boar reproductive functions. **Commission of the European Communities**. p.71-82. Luxemburg. 1987.

PARK, C.S.; YI, Y.J. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.53-61. 2002.

PINEDA, M.H. Male reproduction. In: MCDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. **Veterinary endocrinology and reproduction**, 4ed., Philadelphia, London. 571p. 1989.

PIVA, S.; DONIDA, L.G. Dosagem de ácido cítrico e frutose no esperma: método simplificado. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.12, p.39-42. 1980.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J.L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.525-537. 2009.

QUEYRAS, A.; CAROSI, M. Non-invasive techniques for analysing hormonal indicators of stress. **Annali dell Istituto Superiore di Sanità**, v.40(2), p.211-221. 2004.

RAMOS, F.S. **Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination**. 2004. 47f. Dissertação (Mestrado) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences - Uppsala, 2004.

ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; VAZQUEZ, J.M.; BOLARÍN, A.; HERNANDEZ, M.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, E.A. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v.62, p.261-275. 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; WALLGREN, M. Advances in boar semen cryopreservation. **Veterinary Medicine International**, v.2011, 5 p., ID396181. 2010.

ROMERO, C.A.; MARTINEZ, P.C.; PASCUAL, M.A.H. . Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. **Suínos & Cia**, v.2, n.6, p.28-33. 2004.

RUCKEBUSCH, Y.; PHANEUF, L.P.; DUNLOP, R. **Physiology of small and large animals**. Philadelphia: Decker, p.513-520. 1991.

SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S.; MEINCKE, W.; FREITAS, A.R. . **Eficiência a campo do sêmen suíno congelado**. Comunicado técnico, n.46, EMBRAPA – CNPSA. 1982.

SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. **Suínos & Cia**, v.1, n.1, p.25-28. 2002.

SILVEIRA, P.R.; CABRAL, H.C.; FÁVERO, J.A.; COLDEBELLA, A. **Relato de caso sobre índices reprodutivos obtidos com o uso de sêmen suíno congelado em macro-palhetas**. Comunicado Técnico, n.443, EMBRAPA – CNPSA. 2006.

SINGH, J.P.; BABCOCK, D.F.; LARDY, H.A. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. **Biochemistry Journal**, v.172, p.549-556. 1978.

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.335-346. 2009.

SMITS, H. O futuro da inseminação artificial. **Suínos & Cia**, v.4, n.17, p.54-56. 2006.

SPENCER, K.W.; PURDY, P.H.; BLACKBURN, H.D.; SPILLER, S.F.; STEWART, T.S.; KNOX, R.V. Effect of number of motile, frozen-thawed boar sperm and number of fixed-time inseminations on fertility in estrous-synchronized gilts. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.259-266. 2010.

STONE, B. A. Heat induced infertility of boars: The inter-relationship between depressed sperm output and fertility and an estimation of the critical air temperature above which sperm output is impaired. **Animal Reproduction Science**. v. 4, p. 283-299. 1982.

SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N., KUNAVONGKRIT, A., EINARSSON, S. Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars under different housing systems in Thailand. **Livestock Production Science**. v. 89, p. 19-31. 2004.

SURIYASOMBOON, A. **Herd Investigations on Sperm Production in Boars, and Sow Fertility under Tropical Conditions**. 2005. 52f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, Departamento de Ciências Clínicas, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

SYDENSTRICKER, K.V. **Análise de Lanternim em Edificações para Suínos através de Modelos em Escala**. 77f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1993.

TOUMA, C.; SACHSER, N.; MÖSTL, E.; PALME, R. Effects of sex and time of day in metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **General and Comparative Endocrinology**, v.130, p.267-278. 2003.

- TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of a biological validation. **Animal New York Academy Science**, v.1046, p.54-74. 2005.
- TRUDEAU, V.; SANFORD, L. M. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar. **Journal Animal Science**. v. 63, p. 1211-1219. 1986.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179. 2002.
- VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1-6. 1998.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.481-492. 2000.
- WATSON, P.F.; BEHAN, J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**, v. 48, p. 1683-1693. 2002.
- WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Inseminação Artificial em Suínos. In : SOBESTIANSKY, J. et al. **Suinocultura Intensiva – produção, manejo e saúde do rebanho**. ed.1. Concórdia: EMBRAPA-CNPQA, 388 p. 1998.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur tiefgefrierung von ebersperma. **Deutschland Tierarzt. Wacherisch.**, v.82, p.26-67. 1975.
- WETTEMANN, R.P.; WELLS, M. E.; JOHNSON, R. K. Reproductive characteristics of boars during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**. v. 49, p. 1501-1505. 1979.
- WONGTAWAN, T.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. **Theriogenology**, v.65, p.773–787. 2006.
- YANG, C.C.; LIN, Y.S.; HSU, C.C.; TSAI, M.H.; WU, S.C.; CHENG, W.T.K. Seasonal effect on sperm messenger RNA profile of domestic swine (*Sus Scrofa*). **Animal Reproduction Science**, v.119, p.76-84. 2010.
- ZIMMERMAN, K.J.; CRABO, B.G.; MOORE, R.; WEISBERG, S.; DEIBEL, F.C.; GRAHAM, E.F. Movements of sodium and potassium into epididymal boar spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.21, p.173-181. 1979.

ANEXOS

ANEXO A

Descrição da metodologia de dosagem do ácido cítrico seminal segundo Piva & Donida (1980).

Reagentes:

- a) Anidrido Acético P.A. gelado.
- b) Piridina P.A. gelada.
- c) Solução Aquosa de Ácido Tricloroacético a 10% (p/v).
- d) Solução Padrão de Ácido 8 mg/mL.

Ácido Cítrico P.A. 800 mg

Água Destilada (qsp) 100 mL

Estocar em frasco âmbar a 4°C. Estável por 6 meses. Aliquotar em volumes de 2 mL.

Técnica:

- a) Centrifugar uma alíquota de esperma homogeneizado por 10 minutos a 3.000 rpm.
- b) Marcar 3 tubos de centrifugação, ou de 13 × 100 mL de capacidade.

Reagentes/Tubos	Branco	Padrão	Teste
Água destilada	0,1 mL	-	-
Padrão	-	1,0 mL	-
Esperma	-	-	0,1 mL
Ácido Tricloro Acético 10%	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Agitar em agitador Vórtex por 60 segundos			

- c) Em outros três frascos de ensaio de 13 × 100 mm, marcados Branco, Padrão e Teste, pipetar 0,02 mL dos respectivos sobrenadantes.

d) Pipetar em cada tubo 3,0 mL do reagente de cor (preparar 8 mL de Piridina gelada + 4 mL de Anidrido Acético gelado e misturar lentamente em banho de gelo).

Homogeneizar. Deixar em repouso em banho de gelo por mais 10 minutos.

Tirar do banho de gelo e deixar em temperatura ambiente durante 30 minutos.

Ler contra o Branco a 420 nm.

$$\text{Cálculo} = \frac{\text{D.O. Teste}}{\text{D.O. Padrão}} \times 8 = \text{mg/mL}$$

ANEXO B

Descrição da metodologia de dosagem da frutose seminal segundo Piva & Donida (1980).

Reagentes:

a) Solução Aquosa de Resorcina P.A. a 1% (p/v). Dissolver 1 grama de Resorcina P.A. em água deionizada, até a dissolução total. Completar o volume da solução para 100 mL em balão volumétrico. A solução é estável por 30 dias, a 4°C e em frasco âmbar.

b) Solução Aquosa de Ácido Clorídrico a 30% (v/v). Diluir 30 mL de Ácido Clorídrico concentrado em água destilada para um volume final de 100 mL em balão volumétrico. Solução estável a temperatura ambiente.

c) Solução Padrão de Frutose 5 mg/mL. Dissolver 500 mg de Frutose P.A. em 100 mL de água deionizada. Estocar em alíquotas de 2 mL a -20°C. Estável por 2 meses.

d) Solução Aquosa de Ácido Tricloroacético a 10%.

Técnica:

Em tubos de ensaio de 13 × 100 mm, marcados Branco (A), Padrão (P) e Teste (T), pipetar:

Reagentes/Tubos	Branco	Padrão	Teste
Água destilada	1,0 mL	0,8 mL	0,8 mL
Padrão	-	0,2 mL	-
Esperma	-	-	0,2 mL
Ácido Tricloroacético a 10%	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

- Agitar bem os tubos – Vórtex.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.

- Passar 1,0 mL de cada sobrenadante para outros tubos correspondentes, marcados Branco (B), Padrão (P) e Teste (T).

Reagentes/Tubos	Branco	Padrão	Teste
Sobrenadante	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Solução de Resorcina	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Agitar bem os tubos – Vórtex.			
HCl a 30%	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL

- Agitar bem os tubos – Vórtex.
 - Banho-maria fervente por 5 minutos. Esfriar em banho de água gelada.
- Ler a 530 nm contra o Branco.

$$\text{Cálculo} = \frac{\text{D.O. Teste}}{\text{D.O. Padrão}} \times 5 = \text{mg de Frutose/mL de esperma}$$

TRABALHO CIENTÍFICO

CONGELAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO EM DIFERENTES MEIOS DILUIDORES

Nina Miglioranza Velloso¹
Gabriel Augusto Monteiro¹
José Antônio Dell'Aqua Junior²
Frederico Ozanam Papa²
Eunice Oba²

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da combinação de 2 meios de refrigeração e 2 meios de congelação sobre as características físicas do sêmen suíno. Foram utilizados 8 ejaculados de 10 cachacos de raças híbridas (n=80), sendo os ejaculados transportados a 20°C por 3 horas nos diluentes de refrigeração BTS e BSUI. Foram avaliadas as características do movimento espermático por exame computadorizado (CASA) e de integridade das membranas plasmáticas empregando as sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína. Os ejaculados foram centrifugados e os pellets ressuspensos em 2 diferentes diluentes de congelação, TRIS e BBB, ambos contendo 2% de glicerol e 2% de metilformamida. A concentração espermática foi ajustada para 100x10⁶/mL e uma nova avaliação pelo CASA foi efetuada. Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5mL e refrigeradas por 7 horas, a uma curva de resfriamento de 0,1°C/minuto nas primeiras 3 horas e de 0,05°C/minuto nas 4 horas restantes. Após a congelação e descongelação das palhetas, a cinética espermática e a integridade de membranas foram novamente avaliadas. Para as variáveis motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membranas, não foram constatados efeitos significativos (p>0,05) dos diluentes de refrigeração BTS e BSUI, porém a velocidade média da trajetória foi superior no BSUI. Já na análise realizada após a centrifugação e ressuspensão dos pellets nos meios de congelação, a motilidade progressiva encontrada na combinação BTS/BBB foi superior a obtida com uso de BSUI/TRIS, cuja velocidade curvelinear foi maior que a encontrada no diluente BTS/BBB. No sêmen descongelado, foi observado efeito significativo (p<0,05) dos diluentes sobre as variáveis motilidade total, motilidade progressiva, espermatozóides rápidos e integridade de membranas, sendo os resultados alcançados pelo meio BSUI/TRIS superiores aos do meio BTS/BBB nos três primeiros parâmetros, e a integridade de membranas do meio BTS/TRIS mais elevada do que a obtida com uso do meio BSUI/BBB. Portanto, ao levar em consideração as variáveis de cinética espermática e a integridade de membranas, observou-se que o diluente de congelação TRIS foi capaz de manter maiores índices de viabilidade espermática pós-descongelação do sêmen suíno, porém testes de fertilidade devem ser realizados para avaliar a real superioridade deste meio e seu significado biológico.

Palavras-chave: suíno, sêmen, congelação, diluentes.

Entidade Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

¹ Aluno de Doutorando – FMVZ-UNESP-Botucatu- Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

* Correspondência: Nina Miglioranza Velloso, End.: Distrito de Rubião Jr. s/n, Cep: 18618-000, Botucatu, SP, ninamiglioranza@yahoo.com.br, Fone-Fax: (14) 3811-6249

² Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP-Botucatu.

FREEZING OF BOAR SEMEN IN DIFFERENT EXTENDERS

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of combining 2 extenders of cooling and 2 extenders of freezing about the physical characteristics of boar semen. We used 8 ejaculates from 10 boars of mixed breed ($n = 80$) and the ejaculated were transported at 20°C for 3 hours in diluents of refrigeration BSUI and BTS. It were evaluated the characteristics of sperm movement over the computer analysis (CASA), plasmatic membrane integrity that employs the fluorescent probes of propidium-iodide and carboxyfluorescein diacetate. The ejaculates were centrifuged and the pellets resuspended in two different diluents for freezing, TRIS and BBB, both containing 2% glycerol and 2% methylformamide. The sperm concentration was adjusted to $100 \times 10^6/\text{mL}$ and a new assessment was conducted by CASA. Then the samples were stored in straws of 0.5 mL and refrigerated for seven hours, at a cooling curve of $0.1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ in the first 3 hours and $0.05^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ in the 4 hours remaining. After freezing and thawing of the straws, the kinetics of sperm and membrane integrity were re-evaluated. For the variables total motility, progressive motility and membrane integrity were not found significant effects ($p > 0.05$) of diluents BSUI and BTS at cooling, but the average speed of trajectory was higher in the BSUI. In the analysis performed after centrifugation and resuspension of pellets in the extenders of freezing, the motility found in the combination BTS / BBB was higher than that obtained with the use of BSUI / TRIS, whose curvilinear speed was higher than that found in the diluent BTS / BBB. In thawed semen, significant effect was observed ($p < 0.05$) of solvents on the variables: total motility, progressive motility, sperm membrane integrity and fast spermatozoa, and the results achieved by extenders BSUI / TRIS were superior to the BTS / BBB in the first three parameters, and the integrity of membranes in the extender BTS/TRIS was higher than that obtained using the middle BSUI / BBB. Therefore, to account for the variables of sperm membrane integrity and sperm kinetic, it was observed that the solvent freezing TRIS was able to maintain higher levels of sperm viability post-thawing of boar semen, however it should be made fertility tests to evaluate the real superiority of this extender and the biologic meaning.

Palavras-chave: swine, semen, freezing, extenders.

CONGELACIÓN DE SEMEN PORCINO EN DIFERENTES EXTENSORES

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la combinación de 2 extensores de refrigeración y 2 extensores de congelación sobre las características físicas del semen porcino. Se utilizó 8 eyaculados de 10 verracos de raza mixta ($n = 80$), y los eyaculados fueran transportado a 20°C durante 3 horas en disolventes de refrigeración BTS y BSUI. Las características del movimiento espermático fueron evaluadas a través de análisis computarizados (CASA) y integridad de la membrana plasmática utilizando sondas fluorescentes de propídio y diacetato de carboxifluoresceína. Los eyaculados fueron centrifugados y los precipitados resuspendidos en 2 diferentes diluyentes para la congelación, TRIS y BBB, los dos contiendo 2% de glicerol y 2% de metilformamida. La concentración de espermatozoides se ajustó a $100 \times 10^6/\text{mL}$ y una nueva evaluación

se llevó a cabo por CASA. Luego las muestras fueron almacenadas en pajuelas de 0,5 ml y refrigeradas durante 7 horas, a una curva de enfriamiento de 0.1°C/minuto en las primeras 3 horas y de 0,05°C/minuto en las 4 horas restantes. Después de la congelación y descongelación de las pajuelas, la cinética del espermatozoide e la integridad de membrana fueran re-evaluado. Para las variables de la motilidad total, la motilidad progresiva y la integridad de la membrana no se encontraron efectos significativos ($p > 0,05$) de los diluyentes BTS y BSUI, pero la velocidad media de la trayectoria fue mayor en el BSUI. En análisis realizada después de la centrifugación y resuspensión de pellets en el medio de congelación, el motilidad progresiva fue mayor en BTS/BBB que la obtenida con el uso de BSUI/TRIS, cuya velocidad curvelinear fue mayor que la encontrada en lo diluyente BTS/BBB. En semen descongelado, se observó efecto significativo ($p < 0,05$) de los disolventes en las variables: movilidad total, motilidad progresiva, espermatozoides rápidos y integridad de la membrana espermática, siendo los resultados obtenidos por medio BSUI/TRIS superiores a aquellos obtenidos por BTS/BBB en los tres primeros parámetros, y la integridad de las membranas en medio BTS/TRIS fue la más alta al que se obtiene utilizando el medio BSUI/BBB. Por lo tanto, a llevar en consideración las variables de cinéticas espermáticas y la integridad de membrana de los espermatozoides, se observó que el disolvente de congelación TRIS fue capaz de mantener niveles más altos de esperma viabilidad post-descongelación del semen porcino, pero testes de fertilidad deben ser realizados para evaluar la real superioridad de este procedimiento y su significado biológico.

Palabras-clave: porcino, semen, congelación, diluyentes.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior parte das inseminações é conduzida com sêmen suíno resfriado entre 15 e 18°C, proporcionando resultados de fertilidade semelhantes aos obtidos pelo uso da monta natural. Devido às dificuldades decorrentes da manutenção da temperatura de armazenamento e à limitação de sua utilização por um período máximo de cinco dias, novas metodologias têm sido estudadas para aperfeiçoar o processo de congelamento (1).

O sêmen suíno criopreservado está disponível para uso comercial desde 1975 (2). Porém, devido à alta susceptibilidade a danos durante o processo de congelamento e ao complicado processo de descongelamento, sua utilização não tem sido observada em larga escala, bem como ocorre com o uso do sêmen refrigerado (3).

As pesquisas realizadas nos últimos 30 anos com o uso de sêmen suíno congelado resultaram em avanços originados, sobretudo, dos estudos efetuados para a avaliação do efeito de diferentes crioprotetores, tipos de palhetas e curvas de congelamento e descongelamento (4), sugerindo que novas soluções crioprotetoras e metodologias diferentes de congelamento devem ser testadas (5).

Durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento, os espermatozoides são expostos a situações adversas a sua homeostase, tornando-os susceptíveis aos choques térmico e osmótico, que podem promover alterações estruturais e funcionais na célula espermática com prejuízos para sua motilidade (6,7). Também ocorrem degeneração do acrossoma e redução da atividade metabólica da célula, as quais influenciam a capacidade fecundante do espermatozoide e sua viabilidade no trato genital feminino (7,8).

Outro fator limitante para a expansão do uso de sêmen suíno congelado é a grande variabilidade na resposta dos machos suínos à congelação, a qual não é possível de ser identificada, até o momento, pelos parâmetros convencionais de avaliação do sêmen *in natura* (4,9). Ainda de acordo com os autores, deve-se considerar também a instabilidade da célula espermática do suíno quando comparada a outras espécies no processo de congelação, o que provavelmente ocorre devido às características da composição da sua membrana celular.

Foram observadas diferenças de até 27% entre os machos nos índices de motilidade após a descongelação (8). Uma das possíveis causas desta marcante diferença entre indivíduos pode ser explicada pelas variações dos níveis de testosterona presentes em cada animal apresentam correlação positiva com a capacidade do sêmen suíno de ser congelado-descongelado (10).

Apesar dos dados atuais de produtividade com sêmen suíno congelado serem desanimadores em termos de perspectivas do uso da técnica em rebanhos comerciais, alguns pesquisadores (11) apontam para um futuro promissor da técnica, com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelação de sêmen.

A conservação do sêmen por meio de criopreservação é um dos objetivos das pesquisas na área da biotecnologia da reprodução e muitos pesquisadores tentam aprimorá-la. Quando ela estiver dominada, trará um grande impulso aos programas de IA, possibilitando o acesso de produtores ao sêmen de machos selecionados, independente da distância que os separa das centrais de IA (12).

Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes diluentes de refrigeração e congelação sobre a qualidade do sêmen descongelado de suínos, incluindo análise das características do movimento espermático e integridade da membrana plasmática.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 10 cachorros em idade fértil (em média 2 anos e 350 Kg), de raça híbrida, sob regime regular de colheita de sêmen, pertencentes a uma granja comercial localizada no município de Capivari, São Paulo.

Colheita dos ejaculados

Semanalmente, foram colhidas amostras de sêmen de cada um dos animais. As colheitas de sêmen foram realizadas em manequim através do consagrado método da mão-enluvada (13), sendo utilizada tanto a fração rica quanto a fração pobre do sêmen. A secreção gelatinosa proveniente das glândulas bulbouretrais foi separada por gaze estéril e posteriormente descartada.

O sêmen foi colhido utilizando um copo de vidro graduado, pré-aquecido a 35°C, esterilizado e protegido por um recipiente isotérmico para que a temperatura das amostras fosse mantida, evitando assim a ocorrência de choque térmico das células espermáticas ao entrarem em contato com o copo coletor. Foram colhidos 8 ejaculados de cada suíno (n=80).

Preparação e transporte das amostras

Após a colheita, os ejaculados foram diluídos na proporção 1:2 (5 mL de sêmen : 10 mL de diluente) em dois diferentes diluentes de refrigeração pré-aquecidos a 37°C, Beltsville Thawing Solution (BTS) e BSUI (Botupharma[®]). Logo após, foram armazenados em caixas de isopor a temperatura de 20°C e transportados ao Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, para posterior avaliação. Uma alíquota de sêmen puro de cada um dos animais foi destinada à análise da integridade de membranas dos espermatozóides.

Processamento e congelamento do sêmen

Assim que os ejaculados resfriados a 20°C chegaram da granja, o sêmen foi prontamente reaquecido a temperatura de 37°C e, em seguida, iniciou-se a avaliação da cinética espermática e da integridade de membranas.

A análise da cinética espermática foi realizada em um analisador computadorizado dos movimentos espermáticos – CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA), onde o material previamente homogeneizado foi avaliado depositando uma alíquota de 10µL de sêmen em câmara de Makler (Mackler Counting Chamber[®], Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C, sendo observados cinco campos aleatórios e o número mínimo de 150 espermatozóides por campo. Os parâmetros de movimento espermático avaliados corresponderam a motilidade espermática total (MoT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s) e espermatozóides rápidos (RAP, %), que considera apenas células que apresentem VAP acima de 70µm por segundo.

Já a avaliação da integridade da membrana plasmática do sêmen diluído em BTS ou BSUI foi realizada de acordo com o método descrito por Harrison & Vickers (14) com os corantes diacetato de carboxifluoresceína (20mM) e iodeto de propídio (7,3 mM). Foi examinada uma alíquota de 4 µL, entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000×. Desta forma, 200 células por amostra foram avaliadas e classificadas segundo Ortman & Rodriguez-Martinez (15).

O protocolo de congelamento do sêmen suíno foi realizado conforme o descrito a seguir.

As amostras transportadas nos dois diluentes (BTS e BSUI[®]) foram centrifugadas a 600 x g por 10 minutos para remoção do plasma seminal e concentração dos espermatozóides na forma de *pellets*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em dois extensores de congelamento: TRIS[®] modificado (Botupharma[®]) e BBB[®] (Botupharma[®]), ambos com 2% de glicerol e 2% de metilformamida como crioprotetores intracelulares. A concentração espermática foi ajustada para 100x10⁶/mL (esta concentração foi adotada com o intuito de viabilizar a utilização do CASA para a avaliação da cinética espermática). Os espermatozóides ressuspensos nos dois diluentes de congelamento foram novamente avaliados quanto à cinética espermática e integridade de membranas plasmáticas. As amostras foram então envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico a temperatura ambiente. Posteriormente, as palhetas foram refrigeradas em caixa isotérmica Botutainer[®] (Biotech Botucatu[®]) por 3 horas, a uma curva de resfriamento de 0,1°C/minuto, até alcançarem a temperatura de 15°C. Decorrido este período, as amostras foram refrigeradas por 4 horas, a uma curva de resfriamento de 0,05°C/minuto,

até alcançarem a temperatura de 5°C. Finalmente foi realizada a curva de congelação em caixa de isopor, onde as palhetas foram mantidas a 3 cm do nível do nitrogênio líquido a -120°C por 20 minutos para, em seguida, serem mergulhadas neste, cuja temperatura é de -196°C. Após a congelação das palhetas, as mesmas foram armazenadas em botijão criobiológico até a realização das análises.

O protocolo de congelação foi desenvolvido pelo Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu.

Avaliação do sêmen descongelado

A descongelação das palhetas foi realizada em banho-maria a 46°C por 20 segundos (16). Após a descongelação, as palhetas foram mantidas a 37°C por 10 minutos e então a cinética espermática e a integridade de membranas foram novamente avaliadas por um único avaliador conforme descrito no item anterior.

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos por meio da análise dos parâmetros seminais, foram considerados três momentos durante a preparação dos ejaculados para a posterior congelação: pré-centrifugação, pós-centrifugação e pós-descongelação.

O momento pré-centrifugação foi aquele onde os ejaculados foram avaliados no laboratório logo após sua chegada, quando já estavam diluídos nos diluentes de refrigeração em BTS e BBB.

Já o momento pós-centrifugação ocorreu quando os ejaculados foram avaliados após sua centrifugação, eliminação do sobrenadante e posterior ressuspensão dos pellets nos diluentes de congelação BSUI e TRIS.

Finalmente, o terceiro e último momento, pós-descongelação, refere-se às análises das características físicas das células espermáticas realizadas após o descongelamento das palhetas.

Análise estatística

Para as análises da cinética espermática e da integridade de membranas foi efetuada a comparação dos dados através da análise de variância (ANOVA). Uma vez detectada diferença estatística, ao nível de significância (α) de 5%, foi realizado o teste Tukey para identificar os pares diferentes. Caso os dados analisados da maneira acima descrita não passassem pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), realizou-se teste de ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis - ANOVA on ranks) seguido, quando necessário, pelo teste de Dunn. Quando comparados somente dois grupos (por exemplo, inverno versus verão) utilizou-se o teste t de Student, também a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observados efeitos significativos ($p>0,05$) dos diluentes sobre as variáveis motilidade total (MoT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membranas (IM) no momento pré-centrifugação. Porém, neste mesmo momento, a velocidade média da trajetória (VAP) foi significativamente ($p<0,05$) superior no diluente BSUI, havendo ainda uma tendência ($0,10<p>0,05$) para que o mesmo

ocorresse com a variável velocidade curvelinear (VCL). Os valores destes parâmetros estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Parâmetros de motilidade como porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade curvelinear (VCL), velocidade média na trajetória (VAP) e velocidade linear progressiva (VSL) são usados para diferenciar os padrões do movimento espermático (17). Segundo Verstegen et al. (18), a velocidade média da trajetória (VAP), a velocidade curvelinear (VCL) e a velocidade linear progressiva (VSL) são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócitos é menor que 50%.

Tabela 1. Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) no momento pré-centrifugação entre os meios BTS e BSUI

	BTS	BSUI	P
MoT (%)	87,3 ± 6,6	87,8 ± 5,7	0,782
MP (%)	50,4 ± 12,8	45,7 ± 11,3	0,139

Letras minúsculas distintas indicam diferenças nas linhas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Comparação dos valores médios e desvio padrão dos valores espermáticos VAP, VSL, VCL, RAP e IM entre os diluentes BTS e BSUI no momento pré-centrifugação

	VAP	VSL	VCL	RAP	IM
BTS	99,9±13,0 ^a	73,4±10,2	180,8±25,7	83,2±7,5	81,5±9,2
BSUI	107,2±15,1 ^b	75,5±9,8	193,7±25,8	83,9±6,4	84,0±7,8
p	0,045	0,420	0,058	0,845	0,277

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística nas linhas ($p < 0,05$).

Após a centrifugação dos ejaculados e a ressuspensão dos pellets nos diluentes de congelamento TRIS e BBB, a motilidade total (MoT) permaneceu semelhante entre os meios ($p > 0,05$), porém a motilidade progressiva (MP) obtida com uso de BTS/BBB foi superior ($p < 0,05$) àquela obtida com o uso de BSUI/TRIS (Tabela 3). A variável velocidade curvelinear (VCL), em oposição com o ocorrido com a motilidade progressiva (MP), foi superior ($p < 0,05$) no BSUI/TRIS em relação ao BTS/BBB (Tabela 4).

Tabela 3. Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) no momento pós-centrifugação entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB	P
MoT (%)	83,3 ± 8,5	83,1 ± 7,5	84,3 ± 7,7	86,3 ± 4,7	0,283
MP (%)	42,1 ± 10,8 ^{ab}	46,5 ± 9,5 ^b	39,9 ± 9,9 ^a	45,3 ± 9,0 ^{ab}	0,039

Letras minúsculas distintas indicam diferenças nas linhas ($p < 0,05$).

Tabela 4. Comparação dos valores médios e desvio padrão dos valores espermáticos VAP, VSL, VCL e RAP entre os diluentes BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-centrifugação

	VAP	VSL	VCL	RAP
BTS/TRIS	99,9±9,1	69,6±7,3	186,0±14,7 ^{ab}	80,5±10,1
BSUI/TRIS	99,1±12,5	69,7±6,7	188,1±15,7 ^b	81,9±8,9
BTS/BBB	97,8±9,8	70,3±6,4	177,9±18,3 ^a	80,2±8,4
BSUI/BBB	101,6±10,9	71,7±8,0	182,9±18,2 ^{ab}	83,7±5,2
p	0,298	0,738	0,039	0,588

Letras minúsculas distintas indicam diferenças nas linhas (p<0,05).

Após a descongelamento dos ejaculados, as variáveis motilidade total (MoT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides rápidos (RAP) foram superiores (p<0,05) no diluente BSUI/TRIS em relação ao BTS/BBB. Já a integridade de membranas (IM) do meio BTS/TRIS foi maior (p<0,05) que a do BSUI/BBB. Os valores destas variáveis no momento pós-descongelamento estão expressos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT) e motilidade progressiva (MP) no momento pós-descongelamento entre os meios BTS/TRIS, BTS/BBB, BSUI/TRIS e BSUI/BBB.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB	p
MoT (%)	56,2 ± 14,3 ^{ab}	52,4 ± 16,9 ^a	63,3 ± 9,1 ^b	57,9 ± 13,5 ^{ab}	0,027
MP (%)	30,6 ± 9,6 ^{ab}	28,2 ± 11,0 ^a	36,1 ± 6,3 ^b	31,9 ± 9,2 ^{ab}	0,013

Letras minúsculas distintas indicam diferenças nas linhas (p<0,05).

Tabela 6. Comparação dos valores médios e desvio padrão dos valores espermáticos VAP, VSL, VCL, RAP e IM entre os diluentes BTS/TRIS, BSUI/TRIS, BTS/BBB e BSUI/BBB no momento pós-descongelamento.

	VAP	VSL	VCL	RAP	IM
BTS/TRIS	78,7±7,6	60,0±6,3	119,5±10,6	47,4±13,6 ^{ab}	42,3±12,5 ^b
BSUI/TRIS	82,0±9,0	62,6±7,8	124,9±11,9	54,0±13,6 ^b	37,3±10,2 ^{ab}
BTS/BBB	76,2±10,8	59,0±7,9	115,5±16,4	43,0±16,9 ^a	36,4±11,1 ^{ab}
BSUI/BBB	79,0±9,3	60,3±7,2	122,3±15,6	49,7±13,7 ^{ab}	31,7±10,3 ^a
P	0,149	0,261	0,058	0,024	0,004

Letras minúsculas distintas indicam diferenças nas linhas (p<0,05).

A superioridade encontrada na integridade de membranas do diluente BTS/TRIS em relação ao BSUI/BBB, o número de espermatozoides rápidos (RAP) significativamente mais elevados no BSUI/TRIS que no BTS/BBB e a MoT e MP do BSUI/TRIS superiores às do BTS/BBB demonstram que o diluente de congelamento TRIS foi capaz de preservar melhor a cinética e as membranas espermáticas durante o processo de congelamento em relação ao uso do diluente BBB.

Bianchi (19) relatou maiores índices de motilidade total (MoT) com o uso do BTS em relação a dois outros meios de refrigeração testados, tanto após a refrigeração quanto após a descongelação dos ejaculados.

Os valores de motilidade total (MoT) e progressiva (MP) de todos os diluentes avaliados nos momentos pré e pós-centrifugação e pós-descongelação encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade total (MoT) pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Pré-centrifugação	87,3 ± 6,6 ^b	87,3 ± 6,6 ^b	87,8 ± 5,7 ^b	87,8 ± 5,7 ^b
Pós-centrifugação	83,3 ± 8,5 ^b	83,1 ± 7,5 ^b	84,3 ± 7,7 ^b	86,3 ± 4,7 ^b
Pós-descongelação	56,2 ± 14,3 ^{ABa}	52,4 ± 16,9 ^{Aa}	63,3 ± 9,1 ^{Ba}	57,9 ± 13,5 ^{ABa}
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças nas linhas, minúsculas distintas indicam diferenças entre colunas (p<0,05).

Tabela 8: Comparação dos valores médios e desvio padrão da motilidade progressiva (MP) pré e pós-centrifugação e pós-descongelação entre os meios.

	BTS/TRIS	BTS/BBB	BSUI/TRIS	BSUI/BBB
Pré-centrifugação	50,4 ± 12,8 ^c	50,4 ± 12,8 ^b	45,7 ± 11,3 ^b	45,7 ± 11,3 ^b
Pós-centrifugação	42,1 ± 10,8 ^{ABb}	46,5 ± 9,5 ^{Bb}	39,9 ± 9,9 ^{Aa}	45,3 ± 9,0 ^{ABb}
Pós-descongelação	30,6 ± 9,6 ^{ABa}	28,2 ± 11,0 ^{Aa}	36,1 ± 6,3 ^{Ba}	31,9 ± 9,2 ^{ABa}
p	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças nas linhas, minúsculas distintas indicam diferenças entre colunas (p<0,05).

Na Tabela 7 podemos observar que a motilidade total (MoT) dos espermatozoides sofreu prejuízos somente após a congelamento, não havendo interferência da centrifugação sobre esta variável. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Maxwell & Johnson (20), cujos resultados indicam que os principais danos à célula espermática ocorrem durante o resfriamento.

O diluente BSUI/TRIS foi o meio que apresentou as maiores motilidades totais (MoT) e progressivas (MP) no sêmen descongelado, além de ser o único meio que não demonstrou diferenças de motilidade progressiva (MP) entre os momentos pós-centrifugação e pós-descongelação. Estes dados corroboram com a superioridade do TRIS em manter a estabilidade espermática no sêmen descongelado.

Apesar de alguns autores, como Almlid & Johnson (21), Holt (22) e Watson (23), afirmarem que o glicerol possui um potencial efeito citotóxico à célula espermática, a combinação de crioprotetores utilizada neste trabalho não conferiu tal efeito de toxicidade aos espermatozoides, fato este que pôde ser observado pelos índices satisfatórios de motilidade alcançados após a descongelação. Estes resultados podem ser atribuídos à associação da metilformamida ao glicerol e à porcentagem utilizada de ambos os crioprotetores (2%). Ball & Vo (24) relatam que as amidas possuem uma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula de água, desempenhando um

mecanismo protetor celular mais eficiente que o glicerol. Bianchi (19) observou a falta de trabalhos testando este crioprotetor no sêmen suíno.

A despeito dos diferentes diluentes utilizados neste trabalho, a técnica e a associação de crioprotetores utilizadas no processo de congelação do sêmen conferiram resultados de motilidade espermática inéditos e superiores aos encontrados atualmente na literatura. Spencer et al. (25) obtiveram MoT média de 38% com uso de sêmen descongelado de suínos, valor este semelhante ao encontrado por Ramos (26), cujo estudo descreve valores entre 37 e 46%, por Calderan et al. (27) e Fraser & Strzezek (28), que relatam médias de 43%, e por Oberlender (29), com médias descritas de 35% de MoT no sêmen suíno descongelado.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a metodologia de congelação aplicada e os meios utilizados apresentaram índices de congelabilidade satisfatórios. O diluente de congelação TRIS foi capaz de conferir uma melhor estabilidade para as variáveis de cinética espermática e de integridade de membranas do que o meio BBB.

REFERÊNCIAS

1. Scheid IR, Silveira PRS. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. *Suínos & Cia.* 2002; 1;1:25-28.
2. Johnson LA. Fertility results using frozen boar spermatozoa. In: *Proceedings of the 1st international conference on deep freezing of boar semen.* 1985:199–222.
3. Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 2008; 70:1225-1233.
4. Bernardi, ML, Bortolozzo FP, Wentz I. Emprego de sêmen congelado na IA de suínos. In: Bortolozzo FP. *Inseminação artificial na suinocultura tecnificada.* Porto Alegre: Pallotti, 2005, 185p.
5. Kuster CE, Althouse GC. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-Cell™ extenders. *Theriogenology*, 1999; 52:365-376.
6. Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 1994; 31:224-238.
7. Hofmo PO, Almlid T. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Reprod Domest Anim*, 1991; 1:111-112.
8. Silveira PR, Cabral HC, Fávero JA, Coldebella A. Relato de caso sobre índices reprodutivos obtidos com o uso de sêmen suíno congelado em macro-palhetas. *Comunicado Técnico*, n.443, EMBRAPA – CNPSA. 2006.
9. Martins NO, Corcini CD, Correa MN, Madeira MP, Perondi A, Corezzolla JL. Métodos de congelamento para sêmen suíno e seus efeitos na motilidade espermática.

In: Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica – VII ENPOS – UFPel, Pelotas, Brasil. 2005.

10. Park CS, Yi YJ. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim Reprod Sci*, 2002; 73:53-61.

11. Smits H. O futuro da inseminação artificial. *Suínos & Cia*, 2006; 4;17:54-56.

12. Watson PF, Behan JR. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 2002; 48:1683-1693.

13. Hancock JL, Howell GJR. The collection of boar semen. *Vet Rec*, 1959; 71:664-665.

14. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1990; 88:343-352.

15. Ortman K, Rodriguez-Martinez H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa package in plastic bags. *J Vet Med*, 1994; 41:37-47.

16. Dell'aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, 2001;68:344-346.

17. Mortimer ST. Casa – Practical aspects. *J Androl*, 2000; 4:515-524.

18. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 2002; 57:149-179.

19. Bianchi I. Congelação de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extra celulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, RS, 2007, 95p.

20. Maxwell WMC, Johnson LA. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 1997; 48:209-219.

21. Almlid T, Johnson LA. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, 1988; 66:2899-2905.

22. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000; 62:3-22.

23. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000; 60:481-492.

24. Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.*, 2001; 22:1061-1069.
25. Spencer KW, Purdy PH, Blackburn HD, Spiller SF, Stewart TS, Knox RV. Effect of number of motile, frozen-thawed boar sperm and number of fixed-time inseminations on fertility in estrous-synchronized gilts. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010; 121:259-266.
26. Ramos FS. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination. Dissertação (Mestrado). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004; 47p.
27. Calderam K, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia T, Corrêa EK, Piassi LM, Ulguim RR, Madeira EM, Deschamps JC. Motilidade de sêmen suíno descongelado com o uso de diferentes crioprotetores. *Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica, – VII ENPOS – UFPel, Pelotas, Brasil. 2005.*
28. Fraser L, Strzezek J. Effect of different procedures of ejaculate collection. Extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007; 99:317-329.
29. Oberlender G, Zangeronimo MG, Murgas LDS, Rocha LGP, Pereira BA, Silva DM. Qualidade espermática do sêmen suíno após o congelamento por diferentes métodos. *XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA, Lavras, Brasil, 2010.*