

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE  
CÁLCIO SOBRE A QUALIDADE  
ESPERMÁTICA DE SÊMEN RESFRIADO DE  
SUÍNO**

**FERNANDA PINHEIRO LIMA**

**2006**

**FERNANDA PINHEIRO LIMA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO SOBRE A  
QUALIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN RESFRIADO DE SUÍNO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**  
**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2006**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Lima, Fernanda Pinheiro

Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática de sêmen resfriado de suíno / Fernanda Pinheiro Lima. -- Lavras : UFLA, 2006.

71 p. : il.

Orientador: Luis David Solis Murgas

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Suíno. 2. Sêmen. 3. Inseminação artificial. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 636.40821

**FERNANDA PINHEIRO LIMA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO SOBRE A  
QUALIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN RESFRIADO DE SUÍNO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para obtenção do título de "Mestre".

**APROVADA em 22 de fevereiro de 2006.**

Prof. Dr. Silvio Luiz de Oliveira - UFG

Prof. Dr. Elias Tadeu Fialho - UFLA

Prof. Dr. José Augusto de Freitas Lima - UFLA

**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

*A Deus,*

*pelos dons da sabedoria, inteligência, conselho, fortaleza e ciência e pelo seu  
Amor infinito e misericordioso.*

*Aos meus pais José e Rosa,*

*pela sabedoria guardada na simplicidade do "ser" e, com o apoio e o  
incentivo, ensinaram-me o verdadeiro caminho da vida.;*

*Ao meu namorado, Alex,*

*pelo seu amor, apoio e compreensão.*

### **OFEREÇO**

Aos meus irmãos, pelo amor, carinho, respeito e admiração e, principalmente,  
pelo apoio a mim dedicado.

A todos que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado durante a  
realização deste trabalho.

### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Especialmente ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, exemplo de cientista dedicado à pesquisa e ao ensino, agradeço não só pela orientação, mas também pelo apoio, amizade, carinho, compreensão e confiança durante o nosso convívio.

Aos membros da banca de avaliação: Prof. Dr. Silvio Luiz de Oliveira, Prof. Dr. José Augusto de Freitas Lima e Prof. Dr. Elias Tadeu Fialho pela colaboração imensurável neste trabalho, disponibilidade, conhecimentos transmitidos, expresso meus agradecimentos.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida e, principalmente, ao Departamento de Veterinária por permitir a realização do curso de Mestrado, pelo acolhimento e ambiente de trabalho.

Aos funcionários Sr. Hélio Rodrigues, pela colaboração na realização do experimento; Miro Almeida Conceição Coelho pelo auxílio durante a realização das análises enzimáticas; Willian César Cortez e Marcos Antônio Machado, do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pelo apoio na realização deste trabalho, principalmente, pela amizade e carinho.

A todos os amigos, especialmente à Daniele de Lima, Ana Luísa Neves Alvarenga, Rodrigo Rossi, Mônica Maciel, Alessandra Dias e Micaela Guidotti, pelo auxílio durante a realização do experimento.

Às minhas amigas Bruna Paola Manetta, Daniele do Nascimento Marcelo, Vanessa Rodrigues Gregório e Michelle Terra pela amizade, carinho, cumplicidade e principalmente pela convivência fraterna.

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação e na realização deste trabalho, agradeço.

## **BIOGRAFIA**

FERNANDA PINHEIRO LIMA, filha de José Pinheiro Lima e Rosa Pinheiro Lima, nasceu em Formiga, Minas Gerais.

Em janeiro de 2004, obteve o título de Médica Veterinária pela Universidade Federal de Lavras.

Em agosto de 2004 iniciou o curso de Mestrado no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, tendo defendido tese em 22 de fevereiro de 2006.

Em novembro de 2004 foi aprovada em concurso público realizado na Prefeitura Municipal de Formiga.

Em março de 2005 tomou posse do cargo de Médica Veterinária, assumindo a supervisão do Departamento de Vigilância Sanitária em Formiga.

## SUMARIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Importância do reprodutor na indústria suinícola .....	3
2.2 Características reprodutivas em suínos .....	5
2.3 Inseminação artificial: biotécnica primordial .....	7
2.4 Tecnologia do sêmen .....	10
2.5 Características da membrana plasmática do espermatozóide .....	12
2.6 O íon cálcio .....	14
2.7 Atividade da enzima aspartato aminotransferase (AAT) no sêmen de suínos .....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Local, animais experimentais e tratamentos .....	19
3.2 Colheita do sêmen .....	20
3.3 Processamento do sêmen .....	21
3.4 Avaliações qualitativas e quantitativas do sêmen .....	24
3.5 Teste de viabilidade espermática .....	25
3.6 Avaliação da resistência das membranas espermáticas .....	26
3.7 Avaliações morfológicas .....	27
3.8 Perfil enzimático .....	27
3.9 Análise estatística .....	28
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
4.1 Motilidade e vigor espermáticos .....	29
4.2 Viabilidade espermática .....	36
4.3 Resistência das membranas espermáticas .....	40
4.3.1 Teste de resistência osmótica .....	40
4.3.2 Teste de termo-resistência .....	43
4.4 Avaliações morfológicas .....	47
4.4.1 Morfologia espermática .....	47
4.4.2 Teste de integridade do acrossoma .....	52
4.5 Avaliação do perfil enzimático .....	55



<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## RESUMO

LIMA, Fernanda Pinheiro. **Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática de sêmen resfriado de suíno.** LAVRAS: UFLA, 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

O experimento foi realizado com o objetivo de testar alguns processos de resfriamento de sêmen suíno, analisar o efeito da adição de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ao diluidor de sêmen BTS e testar o método de avaliação do perfil enzimático da Aspartato Aminotransferase (AAT) sobre a qualidade espermática de sêmen suíno resfriado. Foram utilizados 12 ejaculados de reprodutores com fertilidade comprovada, procedentes do setor de Suinocultura do DZO/UFLA. Estes ejaculados foram diluídos e receberam diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  (A: controle – sem  $\text{CaCl}_2$ ; B:  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM; C:  $\text{CaCl}_2$  5,0 mM; D:  $\text{CaCl}_2$  7,5 mM). As amostras dos ejaculados foram submetidas a três processos de resfriamento: 1 – resfriamento convencional ( $15^\circ\text{C}$ ); 2 – resfriamento lento ( $15^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ); 3 – resfriamento rápido ( $5^\circ\text{C}$ ), sendo que cada ejaculado ficou armazenado por um período de 72 horas (D0 = dia da coleta; D1 = 24 horas; D2 = 48 horas; D3 = 72 horas após a coleta), constituindo os tratamentos experimentais e sendo avaliados a cada 24 horas. Os parâmetros seminais avaliados foram motilidade, vigor e morfologia espermáticos, viabilidade espermática, teste de resistência osmótica, teste de termo-resistência (TTR), integridade de acrossoma e perfil enzimático da AAT. Constatou-se diferença significativa ( $P<0,05$ ) quanto aos níveis  $\text{CaCl}_2$  para os parâmetros de motilidade espermática e teste de termo-resistência. Para as variáveis vigor e morfologia espermática, teste de resistência osmótica, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e perfil da AAT não foi observado efeito da adição de  $\text{CaCl}_2$  sobre estes parâmetros. Quanto ao processo de resfriamento, foi observado diferença significativa ( $P<0,05$ ), para os parâmetros de motilidade e vigor espermáticos, viabilidade espermática após 28 horas e teste de resistência osmótica após 30 horas do início do processo de acondicionamento, sendo que para as demais variáveis não foi observado efeito. Conclui-se que a adição de  $\text{CaCl}_2$  melhorou a motilidade espermática das amostras dos ejaculados suínos e que o processo de resfriamento lento substituiu o processo convencional, sem afetar a qualidade

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Luis David Solis Murgas - UFLA (Orientador), Silvio Luis de Oliveira - UFG, Elias Tadeu Fialho - UFLA, José Augusto de Freitas Lima - UFLA.

espermática do sêmen submetido à refrigeração. A avaliação da AAT não é válida para sêmen resfriado.

## ABSTRACT

LIMA, Fernanda Pinheiro. **Effect of adding chloride of calcium on the spermatic quality of cool swine semen.** LAVRAS: UFLA, 2006. 71 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

The study was carried out aiming to assess some swine semen cooling processes, to assess the effects of adding chloride of calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) into the semen dilutor BTS and to test the method of evaluation of Aspartate Aminotransferase (AAT) enzymatic profile over the cooled swine semen spermatic quality. Twelve samples of ejaculation of breeders with proved fertility were used, supplied by the Swine Breeding section of DZO/UFLA. The samples were diluted and received different concentrations of  $\text{CaCl}_2$  (A: control – without  $\text{CaCl}_2$ ; B:  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM; C  $\text{CaCl}_2$  5,0mM; D  $\text{CaCl}_2$  7,5mM). The samples of ejaculation underwent three processes of cooling: 1 – standard cooling ( $15^\circ \text{C}$ ); 2 – slow cooling ( $15^\circ \text{C}/5^\circ \text{C}$ ); 3 – fast cooling ( $5^\circ \text{C}$ ), and each sample was stored for a period of 72 hours (D0 = day of collecting; D1 = 24 hours; D2 = 48 hours; D3 = 72 hours after the collecting), making up the experimental treatments and therefore being assessed every 24 hours. The seminal parameters assessed were the spermatic motility, strength, and shape, spermatic viability, and osmotic resistance test, test of thermo-resistance (TTR), integrity of acrosome and enzymatic profile of the AAT. A meaningful difference was verified ( $P < 0,05$ ) as for the levels of  $\text{CaCl}_2$  for the parameters of spermatic motility and thermo-resistance test. As for the variables spermatic strength and spermatic shape, osmotic resistance test, spermatic viability, integrity of acrosome and AAT profile, no effects were verified under the addition of  $\text{CaCl}_2$  on such parameters. As for the cooling process, a meaningful difference was verified ( $P < 0,05$ ) concerning the parameters of spermatic motility and spermatic strength after 28 hours and osmotic resistance test after 30 hours from the beginning of the storing process. No effects were observed concerning the other variables. It was concluded that the adding of  $\text{CaCl}_2$  did improve the spermatic motility of the samples of swine ejaculations and that the process of slow cooling is able to replace the standard process without affecting the spermatic quality of semen subjected to cooling. The assessment of AAT is not valid to cooled semen.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Prof. Dr. Luis David Solis Murgas - UFLA (Major Professor), Silvio Luiz De Oliveira - UFG, Elias Tadeu Fialho - UFLA, José Augusto De Freitas Lima - UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos a produção mundial de carne suína passou de 73 para 94 milhões de toneladas (FAO, 2002). A projeção da demanda para o ano de 2020 será de 125 milhões (Delgado et al.1999 citado por Gerrits et al. 2005). No Brasil, entre janeiro e agosto de 2005, as exportações de carne suína tiveram uma receita cambial de US\$ 786,7 milhões, um aumento de 70% em relação ao mesmo período em 2004. Os embarques totalizaram 417.247 toneladas, com um incremento de 26,6% na mesma comparação (PorkWorld, 2005).

A suinocultura brasileira vem crescendo em qualidade e volume de produção, utilizando novas tecnologias e obtendo melhores índices zootécnicos. Essa mudança estrutural no setor está demandando animais com elevada eficiência reprodutiva, sanitária e alimentar associada a uma excelente qualidade de carne.

A dificuldade de preservação de sêmen suíno por períodos prolongados sem alterar sua capacidade fecundante limita a expansão da técnica de Inseminação Artificial (IA). Em suínos, a IA é praticada, utilizando sêmen resfriado, mantido a uma temperatura entre 15 a 18° C até o terceiro dia após a colheita e a diluição. Devido às dificuldades decorrentes da manutenção da temperatura de armazenamento e à limitação, restringindo a utilização por um máximo de três dias, novas metodologias têm sido estudadas, para viabilizar o uso de sêmen resfriado a 5° C ou para aperfeiçoar o processo do congelamento. Assim, a expansão da IA em suínos poderia ser ainda maior, à medida que outras tecnologias de preservação de sêmen suíno forem desenvolvidas.

A refrigeração do sêmen à temperatura de 5° C poderia colaborar para a expansão da IA em suínos, principalmente em regiões onde predominam temperaturas elevadas durante todo o ano. Sendo assim, a possibilidade de

refrigerar o sêmen a 5° C, em refrigeradores comuns, eliminaria a necessidade do uso de refrigeradores com temperatura controlada (15 a 18° C), os quais em geral, possuem um custo mais elevado. Dessa forma, em função de uma considerável redução de custos, o uso de IA poderia ser incrementado, tanto para granjas que possuem programas internos como as que possuem programas externos de IA. Para que o resfriamento de sêmen a 5°C possa ser viabilizado, também é fundamental o desenvolvimento de diluidores capazes de permitir a sobrevivência espermática, mantendo elevada capacidade de fertilização.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo viabilizar alguns processos de resfriamento de sêmen suíno, analisar o efeito da adição do cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática e testar o método de avaliação do perfil enzimático da Aspartato Aminotransferase (AAT) sobre a qualidade espermática de sêmen suíno resfriado.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Importância do reprodutor na indústria suinícola**

A fertilidade de um rebanho suinícola, representada freqüentemente pela taxa de parto e tamanho da leitegada, é uma função de três fatores: fertilidade da matriz, fertilidade do reprodutor e manejo reprodutivo. Na teoria, estes três componentes influenciam na mesma intensidade. No entanto, o reprodutor determina quase 33% da fertilidade total do rebanho, sendo 15 vezes mais importante que a fertilidade de uma matriz isoladamente e, representando metade da influência do manejo reprodutivo em geral (Reis, 1997).

A importância do reprodutor suíno no contexto da atividade suinícola não se resume apenas a sua utilização nos diferentes setores do sistema de produção de suínos, como estimulador para antecipação da puberdade em leitões, do estro durante a lactação, na indução do estro pós desmame, na redução do intervalo desmame-estro e na manutenção dos ciclos estrais e prenhez, mas, principalmente, como reprodutor e doador de sêmen (Oliveira, 2004).

Uma seleção e avaliação criteriosa deve ser realizada nos reprodutores antes de sua introdução nas granjas. Essa seleção permite a introdução de reprodutores de alto potencial genético e de boa fertilidade no plantel, diluindo os prejuízos oriundos da manutenção de reprodutores com baixa fertilidade no rebanho.

Ao receber um reprodutor na granja, deve-se introduzir um animal de alta genética, com bom estado sanitário e com responsabilidade mínima de 5.000 leitões/ano (inseminação artificial) ou 500 leitões/ano (monta natural) (Silva,

2003). Esse aumento da relação reprodutor/fêmea tornou-se indispensável à avaliação da performance reprodutiva dos reprodutores.

O julgamento da aptidão reprodutiva do suíno deve estar fundamentado na saúde hereditária, sanidade e fertilidade do animal. Para o primeiro fundamento recomenda-se que seja realizada uma avaliação dos ascendentes, dos parentes colaterais, do próprio indivíduo e dos descendentes deste reprodutor. Um controle sanitário de reprodutores deve abranger doenças passíveis de serem transmitidas pelo sêmen como Brucelose, Micoplasmose, Leptospirose, Febre Aftosa, Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRS), Parvovirose, Doença de Aujeszky, Peste Suína Africana e Clássica e Adenovirose (Scheid, 1984).

Para avaliação da fertilidade do reprodutor deve ser realizado exame geral do estado de saúde do animal (sistemas cardio-respiratório e digestório e análise das condições orgânicas); exames especiais dos sistemas locomotor (aprumos, condições de locomoção e palpação das articulações) e reprodutor (Hafez, 2003).

É muito importante avaliar o comportamento sexual do animal, como: tempo de reação, intervalo da entrada na sala de colheita e início da ejaculação, duração da ejaculação e realizações de falsas montas (Estienne et al. 2004).

O espermiograma é o último item da avaliação andrológica. Esta avaliação consiste no acompanhamento periódico do número de espermatozoides por ejaculado, motilidade e morfologia espermática, os quais são os parâmetros elementares de um espermiograma. Segundo Vale Filho (1982) citado por Carvalho & Silva Filho (2001) essas avaliações, quando realizadas periodicamente, permitem o estabelecimento de uma curva de produção gamética de um determinado reprodutor e o diagnóstico diferencial



entre diversas patologias do sêmen, como: degeneração testicular, hipoplasia, disfunções epididimárias e outros problemas reprodutivos.

## **2.2 Características reprodutivas em suínos**

A localização anatômica dos testículos nos suínos caracteriza-se por possuir uma orientação posterior, diferentemente do touro, que possui uma apresentação ventral (Stabenfeldt & Edqvist, 1996).

Os testículos têm uma função gametogênica, convertendo os precursores diplóides em células haplóides capazes de realizar a fertilização. Os testículos também possuem uma função endócrina responsável por manter a espermatogênese, os caracteres sexuais secundários e o comportamento sexual nos reprodutores (Etches, 1996).

Os testículos são compostos basicamente de túbulos seminíferos onde são produzidos os espermatozóides. A população celular é constituída pelas células de Sertoli e pelas células intersticiais de Leydig. As primeiras são encontradas revestindo a luz dos túbulos seminíferos, são responsáveis pela produção de: a) estrógeno: encontrado em grandes quantidades no sêmen, a partir da conversão da testosterona para estrógeno, via enzima aromatase; b) inibina: difundida para o cérebro, sendo um importante componente da regulação das gonadotrofinas no reprodutor; c) proteína ligadora de andrógeno (ABP), que facilita a entrada de testosterona do tecido intersticial, para dentro dos túbulos, sob influência do hormônio folículo estimulante (FSH), estando envolvidas na maturação de espermatozóides e produção de hormônios (Cunningham, 1999).

As células de Leydig estão localizadas entre os túbulos seminíferos, em torno de vasos sanguíneos, linfáticos, de nervos e são responsáveis pela

produção de testosterona pelo estímulo do hormônio luteinizante (LH) (Hafez, 2003).

Uma série de túbulos – rete testis – deixa os túbulos seminíferos e conectam-se com os ductos coletores localizados no centro de cada testículo. Durante a espermatogênese os espermatozóides deixam os túbulos seminíferos e entram na rete testis, quando da sua passagem para dentro do epidídimo. A rete testis passa por dentro dos ductos deferentes, os quais, finalmente, formam um ducto espiralado simples denominado epidídimo (Cunningham, 1999).

O epidídimo é a estrutura onde ocorre o processo de maturação espermática e, onde são armazenados os espermatozóides até que ocorra a ejaculação. De cada epidídimo sai um conduto deferente, que leva os espermatozóides até sua desembocadura na uretra pélvica, perto do colo da bexiga. A uretra pode transportar urina ou sêmen, segundo o reprodutor se encontre no momento de micção ou de ejaculação (Romero & Falceto Suis, 2005).

As grandes dimensões das glândulas acessórias (vesículas seminais e glândulas bulbouretrais) do reprodutor suíno contribuem para o grande volume do sêmen produzido por esta espécie. As vesículas seminais são as que produzem a maior parte do volume do ejaculado (300ml) e são responsáveis pelo fornecimento de substratos energéticos para o sêmen suíno, enquanto as glândulas bulbouretrais produzem a fração gelatinosa do ejaculado característico desta espécie. A próstata é uma outra glândula que tem como função neutralizar a acidez das secreções vaginais e dar as características de odor ao sêmen (Romero & Falceto Suis, 2005; Stabenfeldt & Edqvist, 1996).

O pênis é longo (30-50 cm), fibroso e apresenta uma flexura sigmóide que estica durante a ereção e extensão do pênis, terminando numa glândula pouco desenvolvida e com formato de espiral (Hafez, 2003).

A produção diária de espermatozoides parece ocorrer em ritmo constante, da mesma forma que o volume do ejaculado, mas estes parâmetros são reduzidos, quando o sêmen é coletado em maior frequência (Etches, 1996). Para um reprodutor suíno com uma idade média de oito a doze meses, essa produção diária é de  $9,5 \times 10^9$  espermatozóide/ml e para um reprodutor adulto (doze meses) essa produção chega a  $17 \times 10^9$  espermatozóide/ml (Scheid, 1993).

O aspecto do sêmen dos suínos varia de animal para animal e, também, de ejaculado para ejaculado. Esse aspecto pode variar de aquoso, com uma concentração baixa de espermatozóide/ml, até leitoso denso, com uma concentração mais elevada de células espermáticas. Geralmente, o volume de sêmen coletado de suínos treinados pode variar de 100 a 500 ml por ejaculado (Scheid 1993).

### **2.3 Inseminação artificial: biotécnica primordial**

No Brasil a IA de suínos desenvolveu-se a partir do ano de 1975. Mas, somente na década de 90, a difusão desta tecnologia ocorreu com maior intensidade, como conseqüência do crescimento tecnológico da suinocultura no país. No ano de 2002, a IA em suínos representou um mercado anual estimado em R\$7,5 milhões, no tocante ao material de consumo (frascos, diluentes, pipetas, entre outros), ao qual soma-se um valor não quantificado de investimentos em instalações, equipamentos e qualificação de pessoal (Scheid & Silveira, 2002).

Durante décadas passadas, atenção considerável tem sido direcionada ao desenvolvimento de tecnologias reprodutivas. A IA é um exemplo dessa biotécnica, que continua a ser expandida nos sistemas de produção de suínos (Day, 2000). De acordo com Rodriguez-Martinez et al. (2005), a utilização do sêmen do reprodutor suíno em programas de IA triplicou nos últimos 17 anos

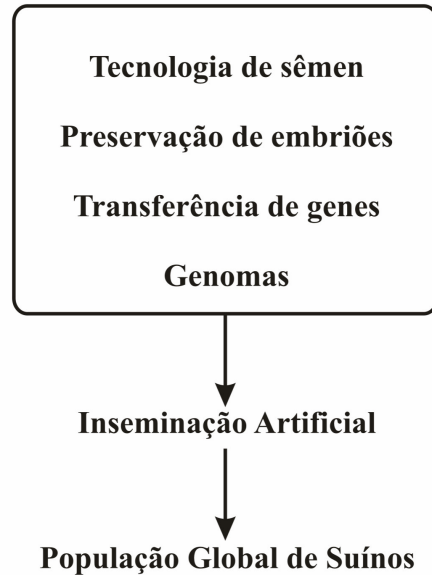
(em muitos países da Europa, mais de 90% das fêmeas são inseminadas e na América do Norte cerca de 70%).

A compreensão e aceitação dos procedimentos para a preparação das doses inseminantes, juntamente com uma grande disponibilização de equipamentos por parte das indústrias associadas ao agronegócio da IA, contribuiu para essa melhora significativa, na qualidade das doses e com uma maior popularização desta tecnologia (Bortolozzo et al. 2005).

Segundo Grossfeld et al. (2005), a IA é a maior tecnologia na qual são construídos os programas de criação animal. Esse vertiginoso aumento que vem ocorrendo no desenvolvimento dos serviços de IA, na maioria dos países, deve-se à elevação da demanda por carne suína de melhor qualidade, aumento da rentabilidade com carcaças com maior valor agregado, juntamente com o melhoramento nos aspectos da técnica de IA, principalmente o desenvolvimento de diversos diluidores para estoque de sêmen a curto e longo prazo (Martinez et al. 2005).

Corroborando com esses autores, Gerrits et al. (2005) afirmam que as biotecnologias genéticas e moleculares facilitarão o desenvolvimento de animais transgênicos, produzirão leitões com características desejadas e resistentes a doenças e parasitas. No campo da biotecnologia da reprodução, a IA foi a primeira tecnologia a ser utilizada e apesar de hoje se falar muito em fertilização *in vitro*, transferência de embriões, sexagem, criopreservação de células espermáticas, injeção intracitoplasmática de espermatozóide, animais transgênicos e técnicas de clonagem, a IA é o passo final para a consolidação de qualquer uma dessas biotecnologias. A figura 1 ilustra a necessidade de integração das múltiplas tecnologias para melhorar a IA.

**Genomas e IA  
para melhorar a Produção Global de Suínos**



**FIGURA 1.** Inseminação artificial (IA) e genomas para melhoramento da produção global de suínos. Fonte: Gerrits et al. (2005).

Atualmente, avanços substanciais têm ocorrido em outras áreas associadas à IA. Numerosas pesquisas têm sido conduzidas para melhorar os métodos de avaliação de sêmen, sua funcionalidade e predição da fertilidade do reprodutor suíno *in vivo*. Outras têm sido focadas para o efeito do tempo de inseminação relativo à ovulação, o papel do plasma seminal, no transporte de espermatozóides, o período de ovulação e a adição de diferentes componentes nas doses inseminantes, para aumentar a performance reprodutiva (Martinez et al. 2005).

Há ainda linhas de pesquisa com diluidores, que têm sido desenvolvidos durante os últimos anos, objetivando o prolongamento do tempo de estoque de três dias para 5-7 dias (Murgas et al., 2002; e Corrêa et al., 2005). Porém, muitos

desses diluidores não têm suas formulações divulgadas por questões de patentes (Gerrits et al. 2005). Mesmo com o advento do armazenamento a longo prazo, a maioria dos produtores realizam a inseminação no primeiro, segundo ou terceiro dia após a colheita do sêmen.

Segundo Scheid & Silveira (2002), como a grande parte da IA em suínos desenvolve-se em sistemas internos, sem comercialização de sêmen e, conseqüentemente, sem a necessidade de reportar-se as atividades para órgãos de controle, inexistem estatísticas sobre o número real de matrizes inseminadas. Estima-se que no ano de 2002 foram realizadas 1,9 a 2,0 milhões de primeiras inseminações, correspondentes a 48% a 50% do total de matrizes tecnificadas e 26 a 28% do total de matrizes do rebanho brasileiro.

Atualmente tem sido possível a expansão da IA na suinocultura, em todo o mundo, com resultados de desempenho reprodutivos cada vez mais consistentes. Se por um lado, pode-se esperar melhorias no rendimento e economicidade da técnica com os avanços tecnológicos previstos para o futuro (IA com doses reduzidas, utilização de sêmen congelado), por outro lado deve se lembrar que a correta aplicação dos conhecimentos e recursos hoje disponíveis também oferece um potencial para a otimização do desempenho da IA (Scheid & Silveira, 2002).

#### **2.4 Tecnologia do sêmen**

O ejaculado do reprodutor suíno pode ser separado em três frações: os espermatozóides, o fluído seminal e o material gelatinoso. Porém, de acordo com Glossop (1996) citado por Corrêa et al. (2000) pode-se detalhar melhor estas frações: fração gelatinosa, que não contém espermatozóides; fração “clara”, que contém poucos espermatozóides; fração rica em espermatozóide,

com aspecto leitoso e opaco; e uma segunda fração “clara”, que contém poucos espermatozóides.

A tecnologia de colheita, avaliação, manipulação e conservação do sêmen adotada nos programas de IA segue um certo padrão mundial. A colheita é realizada pelo método da mão enluvada (King & Macpherson, 1973) com auxílio de manequim; a avaliação da qualidade do sêmen através de parâmetros para volume do ejaculado, motilidade, concentração e morfologia espermática; doses inseminantes de 2,5 a 3,5 bilhões de espermatozóide e com um volume entre 80 e 100 ml; conservação na temperatura de 15-18° C e preservação pelo período médio de três dias.

Em termos gerais, as exigências mínimas para um reprodutor doador de sêmen incluem motilidade espermática (mínima de 70%), vigor três, alterações morfológicas (menos de 20% de formas anormais), volume e número total de espermatozóides do ejaculado (mínimo de 100 ml e 30-60 bilhões, respectivamente, dependendo da idade e do ritmo de coleta) e capacidade de conservação (mais de 60% de motilidade após 48 horas de armazenamento). Segundo Silveira & Scheid (2003), na prática, uma taxa de oito a 23% dos reprodutores não preenche esses critérios.

Muitos fatores externos como estacionalidade, ambiente social, nutrição, raça, temperatura ambiente e idade influenciam de forma negativa a produção espermática ou o comportamento sexual do reprodutor (Silveira & Scheid, 2003).

Johnson et al. (2000) afirmam que o sucesso do resfriamento de sêmen depende da interação de fatores internos, inerentes às características dos espermatozóides e, externos, como a composição dos diluentes e taxa de diluição e de resfriamento.

Existem ainda os fatores associados ao processo da inseminação. Uma inseminação normalmente é realizada em um tempo compreendido entre três e dez minutos. Se a aplicação da dose for muito rápida, ultrapassando a capacidade de absorção do trato genital, pode acarretar refluxo do sêmen para o exterior. Este refluxo a partir da cérvix ou da vagina é a principal causa de perda de espermatozóides, no caso de uma inseminação mal realizada. Na monta natural isso não ocorre, já que o material gelatinoso secretado pelas glândulas bulbouretrais impede a expulsão dos espermatozóides do trato genital, permanecendo até duas horas depois da monta, selando o colo uterino (Martinez et al. 2002).

As características do sêmen *in natura* constituem o passo inicial no controle da qualidade do processo de IA. São essas características que vão definir a adequação do ejaculado, para a produção de doses de sêmen com a qualidade necessária para se obter os benefícios dessa tecnologia.

## **2.5 Características da membrana plasmática do espermatozóide**

O conhecimento da membrana plasmática dos espermatozóides é ponto inicial para o êxito nos processos de manipulação do sêmen, principalmente, tratando-se de espécies como a equina e a suína, as quais possuem baixa resistência dos espermatozóides para manipulação extracorpórea (Valle & Silva Filho, 2001).

Desde que se iniciaram os estudos sobre armazenamento de sêmen de suínos, sabe-se que somente uma porção de espermatozóides da amostra original sobrevive a algum tipo de preservação. Com o declínio da temperatura, há uma redução inevitável na proporção de espermatozóides que permanecem com integridade de membrana e componentes ultraestruturais e bioquímicos normais (Johnson et al. 2000).



Segundo Woelders (1997) a primeira mudança que ocorre na célula durante o resfriamento é a transição de fase dos lipídios presentes na membrana plasmática dos espermatozoides. Estes diversos lipídios possuem temperaturas diferentes para a transição de fase, alguns tipos de lipídios agregam em domínios como lipídios gel, excluindo assim outros tipos de lipídios, que permanecem em estado líquido. As proteínas de membrana são também excluídas desta fase de gel e, conseqüentemente, encontram um meio lipídico não fisiológico (separação da fase lateral). Isto prejudica a função das proteínas de membrana, as quais são necessárias à integridade estrutural do citoesqueleto e ao metabolismo iônico (bombas iônicas).

Os espermatozoides do suíno e do equino são muito susceptíveis ao choque térmico. Esta maior sensibilidade está relacionada à composição da membrana celular (Holt et al. 2005). Uma relação entre colesterol e fosfolipídios polinsaturados inferior a 1:2 resulta em agrupamento de fosfolipídios similares e mudanças da fase fluida para a fase de gel (Amann & Graham, 1993; citados por Purdy & Graham, 2004). Embora regiões de fase lipídica fluida e de gel coexistem à temperatura fisiológica, reduções na temperatura favorecem a transição da fase fluida para a de gel na membrana plasmática (Holt, 2000).

Johnson et al. (2000) afirmam que a relação colesterol/fosfolipídio nos espermatozoides de reprodutores suínos é muito baixa e que o colesterol é distribuído assimetricamente, estando presente mais dentro do que no exterior da monocamada da membrana. Esses autores citam ainda uma outra característica marcante no sêmen suíno: é a menor porcentagem de fosfatidilcolina e alta porcentagem de fosfatidiletanolamina e esfingomielina, que dificultam a estabilidade da membrana espermática.

Conceitos de microarquitetura podem ajudar a explicar porque alguns espermatozoides sobrevivem aos processos de resfriamento e criopreservação,

enquanto outros sofrem ruptura de acrossoma, danos na membrana plasmática e perda de motilidade (Holt, 2000). Corroborando com esta afirmativa, Valle & Silva Filho (2001) afirmam que as moléculas da membrana plasmática estão em constante movimento – mais rápido pelos lipídios e mais lento pelas proteínas. No entanto, quando do resfriamento, a heterogeneidade lipídica da membrana faz com que ocorram áreas fluidas cristalinas ao mesmo tempo, havendo tendências das proteínas se moverem em direção às áreas fluidas, aumentando a permeabilidade naquele local.

## **2.6 O íon cálcio**

O cálcio é o metal iônico mais abundante e um dos mais importantes elementos constitucionais do organismo e da fisiologia celular. Mais de 90% do cálcio corporal é encontrado em ossos e dentes. A outra fração (10%) está na forma solúvel e envolvida em processos fisiológicos de excitação, crescimento e locomoção celular, comunicação intercelular, fusão de membranas, coagulação sanguínea, processos de transporte intracelular, estabilidade de membrana plasmática e fertilização. As funções do cálcio podem ser divididas em extra e intracelular, dependendo de seu sítio de ação (Gilman et al. 1991).

O cálcio intracelular no espermatozóide tem um papel fundamental nos processos de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fertilização. Além disso, o cálcio intracelular é o principal elemento para a motilidade flagelar e fusão da vesícula acrossomal (Darszon et al. 1999).

A motilidade hiperativada é definida como o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozóide no sítio de fertilização, podendo ser estimulada por hormônios, íons e secreções do fluido luminal do oviduto, dependendo da espécie. O cálcio possui uma importante função na regulação da motilidade hiperativada, tanto extra como intracelular, atuando principalmente

no axonema, mas pouco se sabe de seu modo de ação. A membrana plasmática apresenta canais de cálcio voltagem-dependentes, que iniciam e mantêm o aumento intracelular deste íon na hiperativação. O movimento flagelar necessita também do aumento de ATP e AMPc (Suarez & HO, 2003).

O cálcio é um segundo mensageiro intracelular universal, que regula numerosos fenômenos celulares fisiológicos, mas também pode desencadear e participar de eventos patológicos, que levam à injúria celular. Sendo assim, a concentração de cálcio intracelular é heterogênea, ocorrendo em formas de ondas ou picos, pois altas concentrações por longos períodos são tóxicas à célula (Bootman et al. 2001).

Desta forma, as células eucarióticas mantêm baixas concentrações de cálcio intracelular livre em seu citosol (aproximadamente  $10^{-7}$  M), em relação às altas concentrações extracelulares (aproximadamente  $10^{-3}$  M). Uma pequena elevação de cálcio no citoplasma leva a um aumento significativo na sua concentração intracelular, o qual é rapidamente resgatado, promovendo um importante fenômeno, onde o cálcio é liberado de forma oscilatória (em picos). O gradiente de cálcio é mantido por canais presentes na membrana plasmática, que também move ativamente o cálcio para fora da célula ou, ainda, este íon pode ser resgatado para o retículo endoplasmático pela bomba de  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase, dependente de ATP (Alberts et al. 2002).

O mecanismo de mobilização do cálcio (influxo, efluxo e estocagem intracelular) é constituído por: canais seletivos para o cálcio (potencial-dependentes e receptor-operados), trocas de sódio-cálcio, bombas  $\text{Ca}^{+2}$  - ATPase, proteínas ligadoras de cálcio (calmodulina e troponina C) e estoques em mitocôndria e retículo endoplasmático. Esse controle preciso das concentrações de cálcio é importante para manter níveis intracelulares baixos e constantes deste íon, pois o cálcio fora de controle é letal à célula e a sua

sinalização (Bootman et al. 2001). Entretanto, o estresse ou traumas celulares resultam no distúrbio da homeostase de cálcio intracelular, levando a disfunções celulares (Lane & Bavister, 1998).

O retículo endoplasmático e a mitocôndria constituem as maiores fontes intracelulares de cálcio. A sua liberação depende de sinais elétricos, químicos ou anatômicos sobre bombas de cálcio, ativação de cátions, canais de cálcio ou atividade de trocas iônicas (Bootman et al. 2001).

Os canais de cálcio são responsáveis pela entrada desse íon na célula em resposta à sinalização da membrana. Esses canais podem ser classificados em canais voltagem-dependentes, que são ativados pela despolarização da membrana, por estímulos químicos ou elétricos e canais receptor-operados, que estão associados à ativação de receptores por alterações químicas. Esses canais iônicos são regulados pelo AMPc dependente de proteína quinase (Janis et al. 1987).

Uma das vias de entrada do íon cálcio no espermatozóide faz-se no início da fertilização, onde ocorre a despolarização da membrana plasmática e, com isso, a abertura dos canais de íons cálcio voltagem-dependentes, levando a reação acorssomal. Portanto, desde o início da vida, a fertilização e o desenvolvimento embrionário são regulados pelo cálcio (Bootman et al. 2001).

## **2.7 Atividade da enzima aspartato aminotransferase (AAT) no sêmen de suínos**

Nenhum método tradicional de avaliação da qualidade e dos danos espermáticos, que ocorrem durante os procedimentos de manipulação do sêmen apresenta resultados satisfatórios, quando avaliado individualmente. A motilidade e a fertilidade são as técnicas mais utilizadas para avaliar o potencial

reprodutivo dos reprodutores. Porém, o resultado da fertilidade do animal requer um considerável número de animais, tempo e recursos financeiros. Além disso, as diferenças peculiares entre as fêmeas podem confundir a interpretação dos resultados (Borque & Ayllón, 1996). Dessa forma, a análise laboratorial da aspartato aminotransferase (AAT) pode ser um dos critérios utilizados para avaliar a capacidade fertilizante dos espermatozóides, uma vez que esta enzima apresenta fundamental importância para o seu metabolismo relacionado com a região intermediária da cauda da célula espermática, denominada bainha mitocondrial (Moreno et al. 2001).

A função metabólica da AAT está relacionada à participação da enzima nos processos energéticos dos espermatozóides. Nas células prostáticas, a enzima participa da produção de citrato (Costello et al., 1988; citado por Ciereszko et al., 1990).

Alguns pesquisadores têm utilizado o perfil enzimático da AAT, no sêmen submetido a diversos fatores físico-químicos, para prever a fertilidade dos espermatozóides. Esses autores afirmam que a detecção de uma baixa atividade da AAT na célula é um indicativo de lesão na sua estrutura, determinando a liberação dessa enzima para o meio extracelular (Pursel et al., 1969; citado por Moreno et al., 2001).

Segundo Swidowicz & Strzezek (1986) citados por Ciereszko et al. (1992), os estudos andrológicos por meio da medida da atividade da AAT são simples devido à relativa facilidade com que esta é liberada do espermatozóide depois deste passar por processo de resfriamento e, principalmente, de congelamento. Embora a atividade da AAT ser correlacionada à qualidade de sêmen e fertilidade do reprodutor, há uma notável variabilidade na atividade relacionada à sazonalidade e idade do animal. A variabilidade pode ser devido à

baixa estabilidade da AAT, como notado depois de purificação da enzima do sêmen do reprodutor suíno.

Num estudo conduzido por Ciereszko et al. (1992), para avaliar e caracterizar a atividade da AAT no sêmen de reprodutor suíno e determinar o efeito na taxa de diluição, ficou definido que a atividade da AAT que tinha saído do espermatozóide aumentava gradualmente durante o período de estoque em vários diluentes a uma temperatura de 16-18° C.

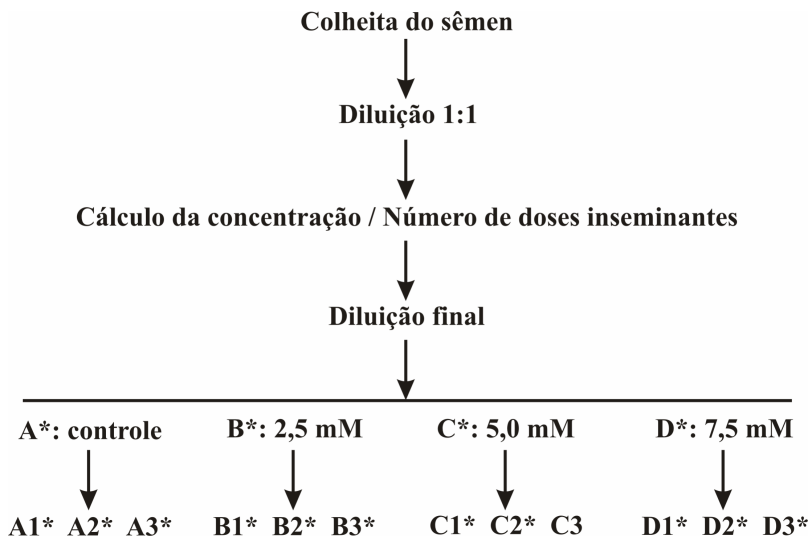
Em um outro estudo, a correlação entre motilidade de espermatozóide e concentração e atividade de AAT foi menor no sêmen fresco, mas muito maior no sêmen submetido a tratamentos laboratoriais como diluição, lavagem e armazenamento. Sob o efeito de vários fatores físico-químicos, a enzima sai do espermatozóide e esta parte de atividade parece ser correlacionada à qualidade do sêmen (Ciereszko et al. 1990).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local, animais experimentais e tratamentos

O experimento foi conduzido no setor de Suinocultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) durante o período de janeiro a março de 2005. As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório do Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária. A UFLA está localizada no município de Lavras, região sul do Estado de Minas Gerais, latitude 21° 14' 30"(s), longitude de 45° (O) e altitude de 910 metros. As temperaturas médias, máxima e mínima, registradas durante o período experimental foram 24,9 e 12,0 °C respectivamente.

Foram realizadas 12 colheitas de quatro reprodutores suínos mestiços das raças Large-White X Landrace, com idade entre um a dois anos, sendo os mesmos mantidos sob o mesmo regime de estabulação e manejo alimentar. Estes animais pertencem ao plantel de reprodutores do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da UFLA e são considerados animais de boa fertilidade. No laboratório os ejaculados foram diluídos e receberam diferentes concentrações de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ): A – controle (sem  $\text{CaCl}_2$ ); B –  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM; C –  $\text{CaCl}_2$  5,0 mM; D –  $\text{CaCl}_2$  7,5 mM e passaram por três tipos de processo de resfriamento: 1 – resfriamento convencional (15° C); 2 – resfriamento lento (24 horas a 15° C e 48 horas a 5° C); 3 – resfriamento rápido (5° C), constituindo os tratamentos experimentais e sendo avaliados a cada 24 horas. Cada ejaculado ficou armazenado por um período de 72 horas. A figura 2 esquematiza o croqui do experimento.



**FIGURA 2.** Esquema do processamento do sêmen no laboratório.

\* As letras referem-se aos níveis de CaCl<sub>2</sub>, enquanto os números reportam o tipo de resfriamento.

Os animais foram alojados em baias individuais localizadas em galpão de alvenaria com piso de concreto e cobertura de telhas de cimento e amianto. Os reprodutores receberam em média dois quilos de ração/dia, ração para gestação, à base de milho e farelo de soja, divididos duas vezes ao dia. Ao entrarem em regime de colheita esses reprodutores passaram a receber três quilos de ração por dia e a água *ad libidum*.

### 3.2 Colheita do sêmen

Os reprodutores utilizados neste trabalho encontravam-se em serviço regular (um ejaculado por semana em média). As colheitas foram realizadas sempre no mesmo horário (7:00 horas), na própria baia do animal, utilizando um



manequim móvel e o método da mão enluvada (King & Macpherson, 1973) em frasco graduado, pré-aquecido a 38 °C e protegido por recipiente isotérmico. A separação da fração gelatinosa do ejaculado foi realizada durante a colheita, utilizando-se tripla camada de gaze adaptada ao frasco coletor. Foi coletada somente a terceira fração do ejaculado – a porção rica em espermatozóides.

### 3.3 Processamento do sêmen

Após a colheita, o volume do ejaculado foi medido diretamente pela graduação do copo coletor. O sêmen foi colocado em banho-maria a uma temperatura de 37° C por um período de 20 minutos, tempo este, necessário ao seu processamento. O sêmen primeiramente foi diluído na proporção de 1:1 com diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) comercializado pela Minitub do Brasil®, cuja fórmula está apresentada na Tabela 1. Em seguida foi coletada amostra para a determinação da motilidade, vigor e concentração espermáticos e, desta forma, proceder o cálculo das doses inseminantes, através das seguintes fórmulas:

- **Número total de células (NTC)** = volume (ml) x concentração (sptz/ml)
- **Número de doses inseminantes** = NTC / concentração da dose ( $5 \times 10^9$  sptz/ml)
- **Volume total** = n° de doses x volume da dose (80ml)
- **Volume do diluente** = volume total – volume do sêmen.

**TABELA 1.** Composição química do diluente BTS.

<b>Ingredientes</b>	<b>BTS</b>
Glicose (g)	37,00
Citrato de sódio (g)	6,00
Bicarbonato de sódio (g)	1,25
EDTA (g)	1,25
Cloreto de potássio (g)	0,75
Penicilina G potássica (UI)	500.000
Sulfato de estreptomicina (g)	0,50
Água destilada q.s.p. (ml)	1000

Fonte: Minitub do Brasil Ltda

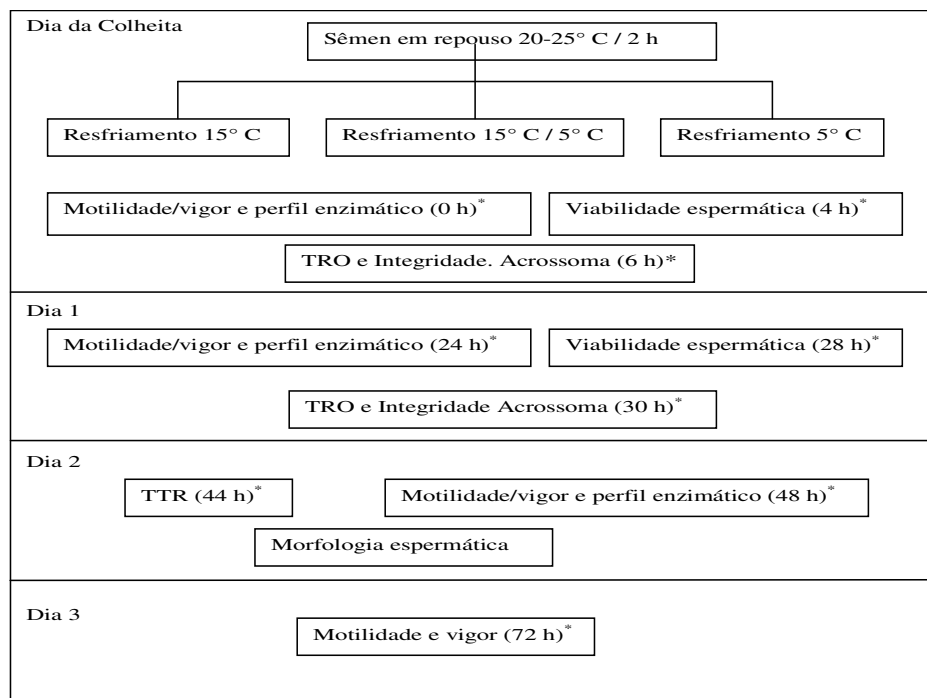
Após determinação do volume do diluente, foi realizada a diluição, acrescentando sempre o diluente ao sêmen, vagarosamente, com agitação constante do frasco de sêmen até completa mistura do diluente. O diluente foi preparado meia hora antes da diluição e mantido em banho-maria a uma temperatura de 32° C.

O sêmen foi então fracionado em quatro provetas pré-aquecidas para o recebimento dos níveis de cloreto de cálcio. A escolha do sal de cloreto baseia-se no fato de que este apresenta uma boa estabilidade e não precipita no meio de diluição.

Nesta fase, então, o sêmen foi envasado em bisnagas contendo 80 ml cada, permanecendo por duas horas em local escuro à temperatura ambiente (25° C). A dose inseminante foi fixada em uma concentração de cinco bilhões de espermatozóides em um volume de 80 ml.

Após esse período de repouso, uma parcela dos preparados foi incubada em geladeira a 15° C (refrigeração convencional), de onde foram retiradas amostras no tempo, em intervalos pré-determinados para a realização das avaliações. A outra parcela dos preparados foi levada diretamente à geladeira a 5° C (refrigeração rápida) e foram realizadas avaliações nos mesmos intervalos propostos à refrigeração convencional. Após permanecerem 24 horas sob refrigeração convencional (15° C), parte das amostras foi levada para o processo de refrigeração rápido (5° C), constituindo o processo de refrigeração lenta, de onde foram retiradas amostras nos mesmos intervalos de tempo.

As análises foram realizadas sobre cada amostra dos ejaculados a cada período de conservação e para cada variável (níveis de CaCl<sub>2</sub>, tipo de refrigeração e tempo) até 72 horas (dia zero = dia da colheita) em intervalos pré-estabelecidos como mostrado na figura 3.



**FIGURA 3.** Esquema das avaliações espermáticas realizadas durante o período de 72 horas após a colheita. \*Indica quantas horas após a colheita os parâmetros espermáticos foram avaliados.

### 3.4 Avaliações qualitativas e quantitativas do sêmen

As primeiras avaliações espermáticas realizadas foram a motilidade e vigor espermáticos e a determinação da concentração. A motilidade geral e o vigor foram avaliados, segundo escalas de 0 a 100 e 0 a 5 respectivamente, segundo metodologia proposta por Scheid (1993). Para esta análise, retirou-se uma gota de sêmen imediatamente após a colheita ou durante os intervalos pré-determinados, sendo esta colocada sobre lâmina, recoberta por lamínula previamente aquecida à temperatura de 37°C, para leitura ao microscópio óptico

(40x). As avaliações foram realizadas em triplicata, independentemente, por dois avaliadores e expressas em percentual de células móveis na amostra. Os períodos de avaliação da motilidade e do vigor espermático foram: 0, 24, 48 e 72, horas após o início do processo de armazenamento (figura 3).

Para análise da concentração espermática, foi retirada uma amostra de sêmen, com auxílio de uma pipeta automática de 0,01 ml para ser adicionada a 1 ml de solução de formol citrato. A contagem foi realizada por meio de hemocitômetro (câmara de Neubauer) na diagonal, com o resultado expresso em número de células/ mm<sup>3</sup> de sêmen. O NTC foi calculado por meio da multiplicação da concentração e volume do ejaculado, segundo a metodologia de Martin Rillo et al. (1996).

### **3.5 Teste de viabilidade espermática**

A observação dos espermatozóides vivos e mortos foi realizada imediatamente após a colheita e também nos intervalos pré-determinados (figura 3). Foram misturadas sete gotas de corante eosina-nigrosina com três gotas de sêmen fresco, em um tubo pequeno e mantidos em banho-maria numa temperatura de 35° C. Em seguida, procedeu-se um esfregaço em lâmina sob placa aquecedora e examinado ao microscópio com objetiva de 40x para identificar os espermatozóides vivos (aparecendo sem coloração) e os mortos (absorveram o corante e se tornaram róseos), segundo metodologia de Mies Filho (1982).

### 3.6 Avaliação da resistência das membranas espermáticas

Procedeu-se também à avaliação da resistência das membranas espermáticas por meio do teste de resistência osmótica e teste de termo-resistência (TTR) em intervalos pré-estabelecidos (figura 3).

O teste de resistência osmótica avalia a resistência da membrana do espermatozóide a períodos de incubação e choque osmótico com a utilização de soluções iso e hiposmótica (Yavetz et al., 1995). O procedimento adotado para avaliação da taxa de resistência osmótica (TRO) foi o proposto por Scheid (1993) e detalhado a seguir:

Foram adicionados 2 ml de solução isosmótica (dilúente BTS com 300 miliosmoles), em um tubo de ensaio e 2 ml de solução hiposmótica (mistura de 50 ml de água destilada e 50 ml de dilúente BTS com 300 mosm) em um outro tubo de ensaio e colocados em banho-maria a uma temperatura de 39° C.

Em seguida, foram adicionados 0,5 ml de sêmen fresco às soluções isosmótica (primeira amostra) e hiposmótica (segunda amostra), sendo incubadas em banho-maria a 39° C por 10 minutos.

A seguir, avaliou-se, em cada amostra, a motilidade das células espermáticas, utilizando-se de microscópio óptico como já descrito anteriormente.

Os valores do índice da TRO foram calculados através da seguinte fórmula:  $TRO = \% \text{ de células com motilidade na primeira amostra} + \% \text{ de células com motilidade na segunda amostra} / 2$ .

Para o TTR foi colocada uma amostra de 2 ml de sêmen previamente aquecido em banho-maria a uma temperatura de 45° C, durante 20 minutos, com observação da percentagem de espermatozoides dotados de motilidade e vigor

espermáticos (Fonseca et al. 1992). O TTR foi realizado 44 horas após o início do processo de armazenamento (Figura 3).

### **3.7 Avaliações morfológicas**

Para a verificação de anormalidades espermáticas foi utilizado 1 ml de formol citrato, ao que foram adicionadas gotas de sêmen até a turvação da solução. Desta solução, homogeneizada, elaborou-se a preparação úmida sem corante, para leitura das alterações morfológicas dos espermatozóides, em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000X, através da contagem diferencial de 100 células, segundo Scheid (1993). Esta avaliação foi realizada após 48 horas de acondicionamento dos ejaculados.

Foi realizado, neste experimento, o teste de integridade acrossômica. A metodologia deste teste é semelhante a anterior. Porém, neste realiza-se a contagem diferencial de 100 células, observando-se apenas alterações de acrossoma. Foram realizados dois testes de integridade de acrossoma, sendo um após às seis horas e o outro após às 30 horas do início do processo de armazenamento.

### **3.8 Perfil enzimático**

A avaliação do perfil enzimático foi conduzida para determinar e caracterizar a atividade da AAT no plasma seminal dos ejaculados, submetidos ao processo de resfriamento. Para a realização desta análise, as amostras de três ejaculados foram coletadas em períodos pré-determinados (Figura 3).

Para essa avaliação enzimática foi utilizado o kit Doles Bioquímica Clínica<sup>®</sup>, segundo a metodologia proposta por Reitman & Frankel (1957). O

procedimento para a realização deste teste é detalhado a seguir: coloca-se 0,5 ml de substrato de AAT em banho-maria a 37 ° C por dois minutos. Em seguida, homogeneíza-se esse substrato em 200 µL da amostra de sêmen incubando a 37 ° C por 30 minutos. Após esse período adiciona-se 0,5 ml de reagente de cor, homogeneíza-se e deixa-se em repouso, em temperatura ambiente (20 – 30 ° C) durante 20 minutos.

Enquanto se aguarda este intervalo é preparada a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,4 M. Todo o volume de NaOH é transferido para um frasco plástico, contendo 600 ml de água destilada ou deionizada. Decorridos, então, os 20 minutos, adiciona-se o substrato à 5 ml de solução de NaOH 0,4 M. Deixa-se em repouso por mais dois minutos, em temperatura ambiente e, então, procede-se à leitura da transmitância, em espectrofotômetro de Coleman, utilizando um filtro de 505 nm e acertando o zero com água destilada.

A curva de calibração utilizada para o cálculo dos resultados da atividade enzimática está indicada no Anexo B.

### **3.9 Análise estatística**

Os parâmetros seminais como motilidade e vigor espermáticos, testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma, TRO, TTR e morfologia espermática, foi adotado o teste de qui-quadrado para verificar a frequência dos dados já que esses dados não foram significativos ao teste de normalidade e nem passíveis de transformação. Para o perfil enzimático foi aplicado o teste F.

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se do programa Statistical Analyses System (SAS, 1995).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Motilidade e vigor espermáticos

Os valores médios da motilidade e vigor espermáticos, das amostras que receberam os diferentes níveis de cloreto de cálcio, estão representados na Tabela 2. As amostras de ejaculados que receberam os maiores níveis de CaCl<sub>2</sub> (5,0 e 7,5 mM) tiveram maiores frequências (77,08 e 77,78% respectivamente), com valores de motilidade espermática significativamente maiores (P<0,05) que os demais níveis, pelo teste de qui-quadrado. Porém, com relação ao vigor espermático não foi observado significância (P>0,05) entre os níveis de CaCl<sub>2</sub>.

**TABELA 2.** Valores médios para motilidade (%) e vigor espermáticos (1 a 5) das amostras dos ejaculados nos diferentes níveis de CaCl<sub>2</sub>.

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Motilidade espermática (%) <sup>*</sup>			Total
		0,0-29,9	30,0-59,9	60,0-90,0	
0	N <sup>o</sup>	10	46	88	144
	%	6,94	31,94	61,11	100,00
2,5	N <sup>o</sup>	11	34	99	144
	%	7,64	23,61	68,75	100,00
5,0	N <sup>o</sup>	08	25	111	144
	%	5,56	17,36	77,08	100,00
7,5	N <sup>o</sup>	07	25	112	144
	%	4,86	17,36	77,78	100,00

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Vigor espermático (1 a 5) <sup>**</sup>				Total
		0,0-0,9	1,0-1,9	2,0-2,9	3,0-3,9	
0	N <sup>o</sup>	1	20	30	93	144
	%	0,69	13,89	20,83	64,58	100,00
2,5	N <sup>o</sup>	0	12	34	98	144
	%	0,00	8,33	23,61	68,06	100,00
5,0	N <sup>o</sup>	0	7	42	95	144
	%	0,00	4,86	29,17	65,97	100,00
7,5	N <sup>o</sup>	0	11	35	98	144
	%	0,00	7,64	24,31	68,06	100,00

<sup>\*</sup>Teste de Qui-quadrado (P<0,05), <sup>\*\*</sup>Teste de Qui-quadrado (P>0,05).

Tonioli & Combarous (1999), trabalhando com tecnologia de sêmen, estudaram também o efeito da adição de cloreto de cálcio ao sêmen suíno. Esses autores utilizaram níveis de  $\text{CaCl}_2$  diferentes (0; 0,041; 0,41; 4,1 e 41mM) e observaram que concentrações maiores de 4,1 e 41 mM desse sal promoveram valores de motilidade maiores aos das outras concentrações até o terceiro dia de acondicionamento. A partir do quarto dia de armazenamento do sêmen, as diferenças foram maiores, com um efeito significativamente favorável à concentração de 4,1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , concluindo que altas concentrações desse sal no meio extracelular têm um efeito negativo sobre a motilidade espermática. Concentrações intracelulares do íon cálcio são mais dependentes de sistemas específicos (canais cálcicos). Pode-se pensar que o cálcio restante dentro do meio extracelular provoque um desequilíbrio nocivo à membrana dos espermatozoides. No presente experimento foi concluído que os níveis de 5,0 e 7,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  influenciaram a motilidade espermática, mantendo maiores frequências de motilidade na escala de 60-90%.

O íon cálcio tem um papel regulador no controle da motilidade e do metabolismo energético do espermatozoide. Após a ejaculação, os espermatozoides passam por um processo de capacitação e a reação acrossômica é acompanhada de um aumento da concentração intracelular de cálcio. No reprodutor suíno, as modificações da permeabilidade de membrana aos íons e, em particular, ao cálcio durante a capacitação, seriam responsáveis pela mudança da motilidade dos espermatozoides (Darszon et al., 1999).

Os resultados de motilidade e vigor espermáticos obtidos durante o processo de resfriamento são apresentados na Tabela 3. Observou-se um efeito significativo ( $P < 0,05$ ) do tipo de refrigeração sobre a motilidade e vigor espermáticos, sendo que a utilização dos processos de refrigeração convencional ( $15^\circ \text{C}$ ) e resfriamento lento ( $15^\circ \text{C} / 5^\circ$ ) proporcionaram as maiores frequências (83,85 e 80,21% respectivamente) com valores de motilidade espermática

maiores que o processo de refrigeração rápida (5° C) (49,48%) na faixa de motilidade de 60-90%.

**TABELA 3.** Valores médios para motilidade (%) e vigor espermáticos (1 a 5) das amostras dos ejaculados nos diferentes tipos de resfriamento.

Tipo de refrigeração		Motilidade espermática (%) <sup>*</sup>			Total
		0,0-29,9	30,0-59,9	60,0-90,0	
15° C	N <sup>o</sup>	7	24	161	<b>192</b>
	%	3,65	12,50	83,85	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	0	38	154	<b>192</b>
	%	0,00	19,79	80,21	<b>100,00</b>
5° C	N <sup>o</sup>	29	68	95	<b>192</b>
	%	15,10	35,42	49,48	<b>100,00</b>

Tipo de refrigeração		Vigor espermático (1 a 5) <sup>*</sup>				Total
		0,0-0,9	1,0-1,9	2,0-2,9	3,0-3,9	
15° C	N <sup>o</sup>	0	17	37	138	<b>192</b>
	%	0,00	8,85	19,27	71,88	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	0	7	44	141	<b>192</b>
	%	0,00	3,65	22,92	73,44	<b>100,00</b>
5° C	N <sup>o</sup>	1	26	60	105	<b>192</b>
	%	0,52	13,54	31,25	54,69	<b>100,00</b>

<sup>\*</sup>Teste de Qui-quadrado (P<0,05).

O vigor espermático comportou-se da mesma maneira, sendo que na escala de 3-4 os processos de refrigeração convencional e o resfriamento lento apresentaram, respectivamente, frequências de 71,88 e 73,44%, enquanto que

com a utilização do resfriamento rápido as frequências obtidas nesta escala foram de apenas 54,69%.

No presente trabalho foi observado que o processo de resfriamento rápido, utilizando o diluente BTS, não é tão eficiente para preservar as características seminais (motilidade e vigor espermáticos) quanto do resfriamento convencional e o lento. Segundo Sone et al. (1992), a utilização do diluidor BTS está condicionada ao processo de resfriamento convencional (15-17° C), sendo que o terceiro dia após a colheita aparece como o limite máximo de utilização compatível com níveis ideais de fertilidade e de prolificidade para os criadores.

Corrêa et al. (2005) avaliaram o efeito de um novo diluente para testar duas temperaturas de acondicionamento do sêmen suíno (5° e 17° C). Os resultados mostraram que o diluente testado (PIGPEL-5) é capaz de manter a viabilidade espermática após o armazenamento a 5° C, comparado ao sêmen acondicionado em BTS a 17° C, quando considerados a motilidade, o vigor e a morfologia espermáticos, teste de estresse térmico e o teste de choque osmótico. Estes autores acima também utilizaram a tabela de distribuição de frequências para avaliação destas variáveis.

Além do diluidor utilizado no resfriamento do sêmen suíno, outras pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar o efeito sobre a motilidade espermática de diferentes tipos de proteínas, que são perdidas durante o processo de manipulação dos ejaculados. No estudo desenvolvido por Huang et al. (1999) foi avaliado o perfil de uma proteína de 90 kDa, a proteína do choque térmico (HSP90). Foi mostrado que houve uma diminuição desta proteína nos espermatozóides e que esta redução ocorreu nas primeiras horas durante o resfriamento a 5° C. Provavelmente, influenciando a motilidade e vigor espermáticos. O período de tempo entre a diminuição da HSP90 e o declínio da

motilidade espermática foi estimado ser de duas a três horas. Esses resultados sugerem que uma substancial redução da HSP90 pode estar associada ao declínio da motilidade espermática durante o resfriamento do ejaculado suíno.

No presente trabalho, 49,48% das amostras apresentaram motilidade espermática entre 60-90% no processo de resfriamento a 5° C. Este resultado mostra que nesta temperatura ocorre uma redução da motilidade espermática provavelmente desencadeada pelo estresse do resfriamento rápido. Graham (1996), estudando o resfriamento do sêmen eqüino a 5° C, afirmou que a motilidade espermática pode ser prejudicada pelo estresse térmico, que afeta a distribuição de componentes lipoprotéicos e a permeabilidade da membrana.

Os valores médios dos parâmetros motilidade e vigor espermáticos durante o período de acondicionamento, estão apresentados na Tabela 4. As diferenças entre os tempos (horas) de conservação foram altamente significativas ( $P < 0,05$ ) tanto para motilidade como para o vigor espermáticos pelo teste de qui-quadrado. Todas as amostras dos ejaculados no tempo zero apresentaram motilidade entre 60-90 % e mais de 80% das amostras apresentaram vigor espermático entre 3-4. Isso confirma a boa qualidade do sêmen processado neste experimento. Após este período, houve uma redução progressiva tanto para a motilidade quanto para o vigor espermáticos. Após 72 horas de acondicionamento, 50,69% das amostras apresentaram motilidade entre 60-90%.

**TABELA 4.** Valores médios para motilidade (%) e vigor espermáticos (1 a 5) das amostras dos ejaculados durante o período de armazenamento.

Período de armazenamento (horas)		Motilidade espermática (%) <sup>*</sup>			Total
		0,0-29,9	30,0-59,9	60,0-90,0	
0	N <sup>o</sup>	0,0	0	144	<b>144</b>
	%	0,00	0,00	100,00	<b>100,00</b>
24	N <sup>o</sup>	8	30	106	<b>144</b>
	%	5,56	20,83	73,61	<b>100,00</b>
48	N <sup>o</sup>	13	44	87	<b>144</b>
	%	9,03	30,56	60,42	<b>100,00</b>
72	N <sup>o</sup>	15	56	73	<b>144</b>
	%	10,42	38,89	50,69	<b>100,00</b>

Horas após a colheita		Vigor espermático (1 a 5) <sup>*</sup>				Total
		0,0-0,9	1,0-1,9	2,0-2,9	3,0-3,9	
0	N <sup>o</sup>	0	0	24	120	<b>144</b>
	%	0,00	0,00	16,67	83,33	<b>100,00</b>
24	N <sup>o</sup>	0	17	28	99	<b>144</b>
	%	0,00	11,81	19,44	68,75	<b>100,00</b>
48	N <sup>o</sup>	1	13	40	90	<b>144</b>
	%	0,69	9,03	27,78	62,50	<b>100,00</b>
72	N <sup>o</sup>	0	20	49	75	<b>144</b>
	%	0,00	13,89	34,03	52,08	<b>100,00</b>

<sup>\*</sup>Teste de Qui-quadrado (P<0,05).

Segundo Bortolozzo et al. (2005), a avaliação da motilidade por períodos prolongados parece ser importante, uma vez que as diluições do sêmen são extremamente altas e a presença de plasma seminal é praticamente nula.

Foxcroft (2002) afirma que a avaliação da motilidade após a diluição pode ser uma forma de identificar animais superiores em termos de fertilidade.

Alguns autores têm observado que a fertilidade dos espermatozóides suínos após IA pode ser mantida pela preservação do sêmen a 15° C, por quatro dias e, que após esse período, o estresse do resfriamento reduz a taxa de fertilidade (Funahashi & Sano, 2005).

A motilidade espermática parece ser um bom indicador da fertilidade espermática em suínos e apresenta uma alta correlação com taxa de penetração em oócitos (Flowers & Turner, 1997; citados por Gadea, 2005).

A avaliação da motilidade e do vigor espermáticos é um procedimento válido uma vez que o espermatozóide geralmente perde sua capacidade de fecundação antes de perder sua motilidade e vigor e, por este motivo, despreza-se ejaculados com motilidade abaixo de 60% e vigor abaixo de 3, pois estes apresentarão espermatozóides com baixa capacidade de fecundação (Silveira Iais 1999). Desta forma, no presente experimento observou-se uma porcentagem elevada (52,08%) de vigor espermático na escala de 3,0-3,9, nas amostras avaliadas 72 horas após a colheita, o que mostra que a viabilidade das amostras é mantida em refrigeração por três dias de acondicionamento.

As avaliações dos parâmetros motilidade e vigor espermático são bons indicadores da qualidade de um ejaculado e representam testes primordiais de um espermiograma. No entanto, estudos têm mostrado que, quando estiver acima de 60,0%, a motilidade espermática não permite a predição da fertilidade do macho suíno, *in vivo* (Flowers, 1996).

Outros trabalhos têm mostrado que machos suínos com variação de motilidade espermática de 53,8% a 72,5%, no oitavo dia de armazenamento do sêmen *in vitro*, não apresentaram diferenças nas taxas de parto e tamanho de leitegada (Xu et al., 1998). Após a inseminação de leitoas com doses de 3

bilhões de espermatozoides, Tardif et al. (1999) não observaram correlação entre a motilidade espermática e a fertilidade, representada pelo número de fetos em relação ao número de corpos lúteos, nas cinco semanas de gestação. Este parâmetro espermático não deve ser utilizado como o único critério para predição da capacidade fecundante de um ejaculado.

#### **4.2 Viabilidade espermática**

Os valores médios encontrados no teste de viabilidade espermática das amostras dos ejaculados, que receberam os diferentes níveis de  $\text{CaCl}_2$ , 4 e 28 horas após o início do processo de acondicionamento, estão apresentados na Tabela 5. A viabilidade espermática não foi significativa ( $P>0,05$ ), pelo teste de qui-quadrado, em nenhum dos períodos avaliados.

Embora o cloreto de cálcio tenha exercido efeito sobre a motilidade espermática, esse sal não foi capaz de melhorar a viabilidade espermática. Provavelmente, quantidades consideráveis de espermatozoides vivos podem ter perdido a capacidade de motilidade, nas amostras com concentrações menores de cloreto de cálcio. Desta forma, pode-se considerar que o cloreto de cálcio favorece o aumento da motilidade espermática por provocar modificações bioquímicas importantes para a função normal do espermatozoide (Nishimura, 1993) e não por favorecer a integridade de membrana espermática.



**TABELA 5.** Viabilidade espermática das amostras dos ejaculados, nos diferentes níveis de CaCl<sub>2</sub>, 4 e 28 horas após o início do armazenamento.

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Viabilidade espermática (4hs)*				Total
		0 - 24	25 -48	49 -72	73 -96	
0	Nº	0	1	9	26	36
	%	0,00	2,78	25,00	72,22	100,00
2,5	Nº	0	0	11	25	36
	%	0,00	0,00	30,56	69,44	100,00
5,0	Nº	1	0	11	24	36
	%	2,78	0,00	30,56	66,67	100,00
7,5	Nº	1	1	10	24	36
	%	2,78	2,78	27,78	66,67	100,00

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Viabilidade espermática (28hs)*				Total
		0 - 24	25 -48	49 -72	73 -96	
0	Nº	1	0	13	22	36
	%	2,78	0,00	36,11	61,11	100,00
2,5	Nº	2	0	6	28	36
	%	5,56	0,00	16,67	77,78	100,00
5,0	Nº	2	1	12	21	36
	%	5,56	2,78	33,33	58,33	100,00
7,5	Nº	2	1	15	18	36
	%	5,56	2,78	41,67	50,00	100,00

\*Teste de Qui-quadrado (P>0,05), 4 e 28 horas após o início do armazenamento.

Os dados de viabilidade espermática das amostras submetidas aos diferentes processos de resfriamento são apresentados na Tabela 6.

**TABELA 6.** Viabilidade espermática das amostras dos ejaculados, nos diferentes tipos de resfriamento, 4 e 28 horas após o início do armazenamento.

Tipo de refrigeração		Viabilidade espermática (4hs)*				Total
		0 – 24	25 -48	49 -72	73 –96	
15° C	Nº	0	0	12	36	<b>48</b>
	%	0,00	0,00	25,00	75,00	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	Nº	0	0	12	36	<b>48</b>
	%	0,00	0,00	25,00	75,00	<b>100,00</b>
5° C	Nº	2	2	17	27	<b>48</b>
	%	4,17	4,17	35,42	56,25	<b>100,00</b>
Tipo de refrigeração		Viabilidade espermática (28hs)**				Total
		0 – 24	25 -48	49 -72	73 –96	
15° C	Nº	0	0	21	27	<b>48</b>
	%	0,00	0,00	43,75	56,25	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	Nº	3	0	6	39	<b>48</b>
	%	6,25	0,00	12,50	81,25	<b>100,00</b>
5° C	Nº	4	2	19	23	<b>48</b>
	%	8,33	4,17	39,58	47,92	<b>100,00</b>

\*Teste de Qui-quadrado ( $P>0,05$ ) às 4 horas; \*\*Teste de Qui-quadrado ( $P<0,05$ ) às 28 horas após o início do armazenamento.

A viabilidade espermática não foi significativa ( $P>0,05$ ) as 4 horas do início do processo de resfriamento, pelo teste de qui-quadrado. No entanto, após 28 horas de acondicionamento houve significância ( $P<0,05$ ) pelo teste de qui-quadrado.

Neste período (28 horas), o processo de resfriamento convencional (15° C) e o resfriamento lento (15° C / 5° C) apresentaram uma proporção de

espermatozóides vivos de 56,25% 81,25% respectivamente, enquanto que no processo de resfriamento rápido esta proporção foi de apenas 47,92%, na escala de espermatozóides vivos de 73-96. O resfriamento lento (15/5° C) protege a membrana espermática do estresse térmico e, também, foi eficiente na preservação da motilidade espermática (Tabela 3). Isso está de acordo com Weber (1989), citado por Johnson et al. (2000), que afirmam que a pré-incubação por pelo menos 24 horas antes de uma possível redução da temperatura abaixo de 15° C aumenta a resistência ao estresse térmico.

Provavelmente, nas primeiras horas (4 horas) após o início do processo de armazenamento os espermatozóides ainda não sofreram os efeitos do resfriamento (estresse térmico, choque osmótico), apresentando estabilidade da membrana espermática e, assim, não permitindo a passagem do corante através da mesma. Após 28 horas, os efeitos do processo de resfriamento do sêmen são mais pronunciados, sendo que as amostras de ejaculados que foram submetidas a um processo de resfriamento lento (15/5° C) adquiriram resistência ao choque térmico, sendo capaz de manter uma maior estabilidade de membrana o que pôde ser refletido nessa maior proporção de espermatozóides vivos (81,25%).

A redução da motilidade que ocorre durante o armazenamento é o principal parâmetro utilizado para julgar a diminuição da capacidade fertilizante. A perda de ATP e AMPc, assim como a tomada reduzida de cálcio, são características da redução da motilidade. Um importante indicador das alterações que ocorre na membrana espermática, devido ao armazenamento é a mudança da permeabilidade dessa membrana, assim há um aumento da permeabilidade para corantes e, também, a liberação de substâncias intracelulares (liberação de cátions e enzimas), redução da atividade enzimática e alterações nos movimentos laterais dos canais iônicos. (Johnson et al. 2000).

### 4.3 Resistência das membranas espermáticas

#### 4.3.1 Teste de resistência osmótica

A taxa de resistência osmótica (TRO) não foi influenciada ( $P>0,05$ ) pelos níveis de  $\text{CaCl}_2$  em nenhum dos períodos analisados (6 e 30 horas), pelo teste de qui-quadrado como mostrado na Tabela 7.

**TABELA 7.** Valores médios para a taxa de resistência osmótica (%) das amostras dos ejaculados, nos diferentes níveis de  $\text{CaCl}_2$ , 6 e 30 horas após o início do armazenamento.

Níveis de $\text{CaCl}_2$ (mM)		Taxa de resistência osmótica (%)* (6 hs)				Total
		0,0-9,9	10,0-19,9	20,0-29,9	30,0-40,0	
0	Nº	21	9	6	0	36
	%	58,33	25,00	16,67	0,00	100,00
2,5	Nº	18	10	8	0	36
	%	50,00	27,78	22,22	0,00	100,00
5,0	Nº	16	6	10	4	36
	%	44,44	16,67	27,78	11,11	100,00
7,5	Nº	14	9	10	3	36
	%	38,89	25,00	27,78	8,33	100,00

Níveis de $\text{CaCl}_2$ (mM)		Taxa de resistência osmótica (%)* (30 hs)				Total
		0,0-9,9	10,0-19,9	20,0-29,9	30,0-40,0	
0	Nº	23	10	1	2	36
	%	63,89	27,78	2,78	5,56	100,00
2,5	Nº	21	11	4	0	36
	%	58,33	30,56	11,11	0,00	100,00
5,0	Nº	14	18	4	0	36
	%	38,89	50,00	11,11	0,00	100,00
7,5	Nº	20	10	5	1	36
	%	55,56	27,78	13,89	2,78	100,00

\*Teste de Qui-quadrado ( $P>0,05$ ), 6 e 30 horas após o início do armazenamento.

Murgas (1999), utilizando a TRO para verificar a viabilidade espermática em reprodutores suínos, não observou correlação deste teste com a motilidade espermática. No presente experimento, os maiores níveis de cloreto de cálcio apesar de ter promovido uma maior proporção de motilidade espermática, o mesmo não ocorreu para o teste de resistência osmótica. Sugere-se que o cloreto de cálcio não exerça efeito sobre a resistência da membrana espermática e sim sobre a capacidade de motilidade espermática. Isso foi observado também no teste de viabilidade espermática, em que o cloreto de cálcio não exerceu efeito sobre a membrana plasmática.

Jeyendran et al. (1984) afirmaram que a técnica de resistência osmótica utilizada para avaliar a integridade funcional da membrana espermática apresenta correlação a capacidade de fertilização *in vitro* dos espermatozoides. Esses autores afirmam ainda que esta técnica pode ser utilizada somando a outras para melhorar as análises de sêmen. A manutenção da membrana do espermatozoide íntegra é fundamental para a reação acrossômica, etapa que antecipa a penetração na zona pelúcida e fecundação (Park, 1997; citado por Goulart et al., 2004).

A resposta do volume celular, a diferentes condições osmóticas, reflete profundas mudanças na membrana espermática, estas são relacionadas à permeabilidade da membrana, para íons maiores, com a funcionalidade dos canais iônicos e a integridade do citoesqueleto nas diferentes espécies (Petrunkina et al. 2005).

Ao se avaliar a influência do tipo de resfriamento sobre a TRO observou-se na Tabela 8, que esta taxa não sofreu influência ( $P > 0,05$ ), após seis horas do início do processo de acondicionamento. No entanto, a taxa de resistência foi significativa ( $P < 0,05$ ), 30 horas após o início do processo de acondicionamento.

**TABELA 8.** Valores médios para a taxa de resistência osmótica (%) das amostras dos ejaculados, nos diferentes tipos de resfriamento, 6 e 30 horas após o início do armazenamento.

Tipo de refrigeração		Taxa de resistência osmótica (%) * (6 hs)				Total
		0-9,9	10-19,9	20-29,9	30-40	
15° C	Nº	22	11	12	3	<b>48</b>
	%	45,83	22,92	25,00	6,25	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	Nº	22	11	12	3	<b>48</b>
	%	45,83	22,92	25,00	6,25	<b>100,00</b>
5° C	Nº	25	12	10	1	<b>48</b>
	%	52,08	25,00	20,83	2,08	<b>100,00</b>
Tipo de refrigeração		Taxa de resistência osmótica (%) ** (30 hs)				Total
		0-9,9	10-19,9	20-29,9	30-40	
15° C	Nº	24	16	5	3	<b>48</b>
	%	50,00	33,33	10,42	6,25	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	Nº	22	17	9	0	<b>48</b>
	%	45,83	35,42	18,75	0,00	<b>100,00</b>
5° C	Nº	32	16	0	0	<b>48</b>
	%	66,67	33,33	0,00	0,00	<b>100,00</b>

\*Teste de Qui-quadrado (P>0,05), 6 horas após o início do armazenamento.

No período de 30 horas após o armazenamento, o tipo de resfriamento convencional promoveu uma maior taxa de resistência osmótica (6,25%) na escala de 30-40. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Roner et al. (2005), que observaram maiores taxas de resistência osmótica no sêmen suíno, armazenado à temperatura de 16° C, em relação à temperatura de 5° C. Segundo esses autores, as diferenças observadas no teste de resistência osmótica estão acentuadas no final do período de armazenamento que durou 72 horas.

A diferença dos resultados nos dois períodos analisados pode ser devido ao fato do envelhecimento da célula espermática, tornando a membrana mais sensível, o que pode estar relacionado à viabilidade espermática, uma vez que esta apresentou comportamento semelhante.

O processo de resfriamento lento faz com que as células espermáticas adquiram certa resistência, também foi observado por Pursel et al. (1973), citado por Johnson et al. (2000), que afirmaram que: quando amostras de sêmen pré-diluído são mantidas por 15° C por diversas horas, os espermatozóides adquirem uma resistência gradual ao choque térmico. Estando as membranas mais resistentes superam também o estresse osmótico a que foram submetidas.

As mudanças que ocorrem nas células incubadas que resistem ao estresse térmico não são totalmente conhecidas. Acredita-se que esse estresse térmico esteja relacionado à composição da bicamada lipídica da membrana, afetando a fluidez da membrana espermática. Quando há uma redução da temperatura, há uma restrição dos movimentos laterais da membrana fosfolipídica, que resulta em transição de fase fluida para a fase de gel. Ocorre uma separação dessas fases devido aos diferentes pontos de fusão dos lipídios da membrana, enquanto que as proteínas aglomeram-se irreversivelmente (Johnson et al. 2004).

#### **4.3.2 Teste de termo-resistência**

Os valores médios dos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos, no teste de termo-resistência (TTR) das amostras, que receberam os diferentes níveis de cloreto de cálcio, estão apresentados na tabela 9. Houve uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de cloreto de cálcio sobre os parâmetros de motilidade e vigor espermáticos pelo teste de qui-quadrado. As amostras de ejaculados que receberam o maior nível de  $\text{CaCl}_2$  tiveram uma maior frequência

(13,89% e 19,44%), para valores de motilidade entre 60-70% e vigor espermáticos entre 3-3,9 respectivamente.

Sabe-se que concentrações intracelulares do íon cálcio são mais dependentes de sistemas específicos (canais cálcicos) do que de uma simples difusão ligado ao estado de membrana (Toniolli & Combarous, 1999). Pode-se pensar que o cálcio em concentrações elevadas ativa, as vias de segundo mensageiro, que irão desencadear os processos de motilidade espermáticas.

**TABELA 9.** Valores médios da motilidade (%) e vigor espermáticos (1 a 5), no teste de termo-resistência das amostras dos ejaculados nos diferentes níveis de CaCl<sub>2</sub>.

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Motilidade espermática (%)*							Total
		0-9,9	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	50-59,9	60-70	
0	Nº	20	8	2	2	2	1	1	36
	%	55,56	22,22	5,56	5,56	5,56	2,78	2,78	100,00
2,5	Nº	18	8	3	4	0	1	2	36
	%	50,00	22,22	8,33	11,11	0,00	2,78	5,56	100,00
5,0	Nº	6	12	4	3	6	2	3	36
	%	16,67	33,33	11,11	8,33	16,67	5,56	8,33	100,00
7,5	Nº	3	6	9	5	4	4	5	36
	%	8,33	16,67	25,00	13,89	11,11	11,11	13,89	100,00
Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Vigor espermático (1 a 5)*							Total
		0-0,9	1-1,9	2-2,9	3-3,9				
0	Nº	7	22	7	0				36
	%	19,44	61,11	19,44	0,00				100,00
2,5	Nº	8	23	3	2				36
	%	22,22	63,89	8,33	5,56				100,00
5,0	Nº	1	23	8	4				36
	%	2,78	63,89	22,22	11,11				100,00
7,5	Nº	0	23	6	7				36
	%	0,00	63,89	16,67	19,44				100,00

\*Teste de Qui-quadrado (P<0,05).



Os resultados dos testes de TTR e motilidade e vigor espermático apresentaram comportamento semelhante quanto à utilização de cloreto de cálcio, observando melhores resultados quando o nível utilizado foi o maior (7,5 mM), enquanto que os resultados dos testes de viabilidade espermática e TRO também apresentaram comportamento semelhante entre si. Foi observado nesses últimos testes que os níveis de cloreto de cálcio não influenciaram seus resultados.

O efeito do processo de resfriamento sobre os parâmetros de motilidade e vigor dos ejaculados submetidos ao teste de termo-resistência estão apresentados na Tabela 10. Não foi constatada diferença significativa ( $P>0,05$ ), pelo teste de qui-quadrado, entre os diferentes processos de acondicionamento.

**TABELA 10.** Valores médios da motilidade (%) e vigor espermáticos (1 a 5), no teste de termo-resistência das amostras dos ejaculados nos diferentes tipos de resfriamento.

Tipo de Resfriamento		Motilidade espermática (%)*							Total
		0-9,9	10-19,9	20-29,9	30-39,9	40-49,9	50-59,9	60-70	
15° C	N <sup>o</sup>	15	10	6	2	7	5	3	48
	%	31,25	20,83	12,50	4,17	14,58	10,42	6,25	100,00
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	12	10	8	6	4	2	6	48
	%	25,00	20,83	16,67	12,50	8,33	4,17	12,50	100,00
5° C	N <sup>o</sup>	20	14	4	6	1	1	2	48
	%	41,67	29,17	8,33	12,50	2,08	2,08	4,17	100,00
Tipo de resfriamento		Vigor espermático (1 a 5)*				Total			
		0-0,9	1-1,9	2-2,9	3-3,9				
15° C	N <sup>o</sup>	4	30	9	5	48			
	%	8,33	62,50	18,75	10,42	100,00			
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	6	28	9	5	48			
	%	12,50	58,33	18,75	10,42	100,00			
5° C	N <sup>o</sup>	6	33	6	3	48			
	%	12,50	68,75	12,50	6,25	100,00			

\*Teste de Qui-quadrado ( $P>0,05$ ).

Desta forma, pode-se considerar que o teste de TTR não é um método sensível para detectar diferenças quanto à resistência de membranas espermáticas, quando se considera o tipo de processo de resfriamento, uma vez que a motilidade e vigor espermáticos apresentaram diferenças significativas de acordo com este procedimento.

Isso pode ser devido às características peculiares da membrana plasmática dos espermatozóides suínos. Segundo Breininger et al. (2005), o estresse térmico gerado no TTR pode ter aumentado a produção de espécies reativas ao oxigênio, que favorecem à peroxidação lipídica das membranas espermáticas.

O tempo de colheita das amostras (44 horas) para avaliação do TTR pode ter influenciado os resultados. Neste experimento não foi observada uma relação do TTR com o TRO, provavelmente pelo período diferente de avaliação. Talvez, com a utilização de colheitas de amostras para TTR no período de seis e de 30 horas, os resultados poderiam ter se igualados aos resultados obtidos no teste de resistência osmótica.

Jeyendran et al. (1984), desenvolvendo uma nova técnica para avaliar a integridade funcional da membrana de espermatozóide humano, avaliou a influência do TTR sobre o teste de resistência osmótica. Esses autores observaram que: quando o espermatozóide é submetido a um moderado choque térmico (56° C) durante 30 minutos e, em seguida, é exposto ao estresse hiposmótico, sofre alteração de membrana e, geralmente, sua taxa de resistência osmótica diminui, comprovando a sensibilidade da membrana espermática durante processos de manipulação.

## **4.4 Avaliações morfológicas**

### **4.4.1 Morfologia espermática**

Os valores encontrados para as alterações morfológicas das células espermáticas, das amostras de ejaculados, que receberam os diferentes níveis de  $\text{CaCl}_2$ , estão apresentados na Tabela 11. Nenhuma das alterações morfológicas foram significativas ( $P>0,05$ ) pelo teste de qui-quadrado.

Segundo Scheid (1993), os limites máximos observados no ejaculado suíno, para se obter uma boa fertilização são assim estipulados: alterações de cabeça, acrossoma e peça intermediária (5%), alterações de cauda espermática (10%) e totais (20%).

Foi observado neste experimento, que independentemente do nível de  $\text{CaCl}_2$  utilizado, as amostras dos ejaculados apresentaram mais de 50% de frequência, para alterações de cabeça dentro do limite proposto. Para as alterações de acrossoma e de peça intermediária mais de 70 e 80%, respectivamente, das amostras apresentaram até cinco alterações. Isto confirma que 48 horas após a colheita, estes ejaculados não foram influenciados pelas concentrações de  $\text{CaCl}_2$ . As alterações de cabeça e de peça intermediária são consideradas primárias, ou seja, originadas durante o processo de formação dos espermatozoides.

Como observado no teste de viabilidade espermática e TRO, em que o  $\text{CaCl}_2$  não exerceu efeito sobre a membrana espermática, foi verificado também que este sal não foi capaz de exercer influência sobre a membrana acrossômica. Estes resultados confirmam a boa qualidade do sêmen processado, principalmente, quando se considera que essas análises foram realizadas 48 horas após a colheita.

**TABELA 11.** Valores médios para morfologia espermática das amostras dos ejaculados nos diferentes níveis de CaCl<sub>2</sub>.

Níveis de CaCl <sub>2</sub>		Alterações de cabeça*				Total
(mM)		0-5	6-10	11-21		
0	Nº	25	9	2	36	
	%	69,44	25,00	5,56	100,00	
2,5	Nº	27	5	4	36	
	%	75,00	13,89	11,11	100,00	
5,0	Nº	21	11	4	36	
	%	58,33	30,56	11,11	100,00	
7,5	Nº	25	10	1	36	
	%	69,44	27,78	2,78	100,00	

Níveis de CaCl <sub>2</sub>		Alterações de cauda*			Total
(mM)		0-10	11-20	21-33	
0	Nº	16	12	8	36
	%	44,44	33,33	22,22	100,00
2,5	Nº	12	17	7	36
	%	33,33	47,22	19,44	100,00
5,0	Nº	16	11	9	36
	%	44,44	30,56	25,00	100,00
7,5	Nº	17	13	6	36
	%	47,22	36,11	16,67	100,00

Níveis de CaCl <sub>2</sub>		Alterações de peça intermediária*			Total
(mM)		0-5	6-10	11-16	
0	Nº	31	4	1	36
	%	86,11	11,11	2,78	100,00
2,5	Nº	32	2	2	36
	%	88,89	5,56	5,56	100,00
5,0	Nº	30	4	2	36
	%	83,33	11,11	5,56	100,00
7,5	Nº	31	3	2	36
	%	86,11	8,33	5,56	100,00

Níveis de CaCl <sub>2</sub>		Alterações de acrossoma*					Total
(mM)		0-5	6-10	11-15	16-20	21-35	
0	Nº	30	5	1	0	0	36
	%	83,33	13,89	2,78	0,00	0,00	100,00
2,5	Nº	28	7	1	0	0	36
	%	77,78	19,44	2,78	0,00	0,00	100,00
5,0	Nº	30	4	1	0	1	36
	%	83,33	11,11	2,78	0,00	2,78	100,00
7,5	Nº	32	3	0	1	0	36
	%	88,89	8,33	0,00	2,78	0,00	100,00

\*Teste de Qui-quadrado (P>0,05).

Por outro lado, as alterações de cauda espermática foram mais elevadas, sendo que em média, somente 42% das amostras de ejaculados apresentaram alterações dentro do limite preconizado (10%). Isso ocorreu, porque 48 horas após a colheita esta estrutura celular é afetada pelas flutuações de temperatura, pH ou de osmolaridade durante a diluição ou no armazenamento.

Neste experimento, independentemente do nível de  $\text{CaCl}_2$  utilizado, as amostras dos ejaculados apresentaram mais de 50% de frequência para alterações de cabeça dentro do limite proposto. Para as alterações de acrossoma e de peça intermediária mais de 70 e 80% das amostras apresentaram até cinco alterações. Isto confirma que 48 horas após a colheita, esses ejaculados não foram influenciados pelas concentrações de  $\text{CaCl}_2$ . As alterações de cabeça e de peça intermediária são consideradas primárias, ou seja, originadas durante o processo de formação dos espermatozoides.

Como observado no teste de viabilidade espermática e TRO, em que o  $\text{CaCl}_2$  não exerceu efeito sobre a membrana espermática, foi verificado também que esse sal não foi capaz de exercer influência sobre a membrana acrossômica. Esses resultados confirmam a boa qualidade do sêmen processado, principalmente, quando se considera que essas análises foram realizadas 48 horas após a colheita.

Por outro lado, as alterações de cauda espermática foram mais elevadas, sendo que em média, somente 42% das amostras de ejaculados apresentaram alterações dentro do limite preconizado (10%), isso ocorreu, porque 48 horas após a colheita esta estrutura celular é afetada pelas flutuações de temperatura, pH ou de osmolaridade, durante a diluição ou no armazenamento.

Na Tabela 12 são apresentados os valores obtidos para a morfologia espermática nos diferentes tipos de resfriamento. Não houve significância ( $P>0,05$ ), pelo teste de qui-quadrado para este parâmetro.

**TABELA 12.** Valores médios para morfologia espermática das amostras dos ejaculados nos diferentes tipos de resfriamento.

Tipo de resfriamento		Alterações de cabeça*			Total		
		0-5	6-10	11-21			
15° C	N <sup>o</sup>	33	12	3	<b>48</b>		
	%	68,75	25,00	6,25	<b>100,00</b>		
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	35	11	2	<b>48</b>		
	%	72,92	22,92	4,17	<b>100,00</b>		
5° C	N <sup>o</sup>	30	12	6	<b>48</b>		
	%	62,50	25,00	12,50	<b>100,00</b>		
Tipo de resfriamento		Alterações de cauda*			Total		
		0-10	11-20	21-33			
15° C	N <sup>o</sup>	25	14	9	<b>48</b>		
	%	52,08	29,17	18,75	<b>100,00</b>		
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	18	22	8	<b>48</b>		
	%	37,50	45,83	16,67	<b>100,00</b>		
5° C	N <sup>o</sup>	18	17	13	<b>48</b>		
	%	37,50	35,42	27,08	<b>100,00</b>		
Tipo de resfriamento		Alterações de peça intermediária*			Total		
		0-5	6-10	11-16			
15° C	N <sup>o</sup>	41	5	2	<b>48</b>		
	%	85,42	10,42	4,17	<b>100,00</b>		
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	39	6	3	<b>48</b>		
	%	81,25	12,50	6,25	<b>100,00</b>		
5° C	N <sup>o</sup>	44	2	2	<b>48</b>		
	%	91,67	4,17	4,17	<b>100,00</b>		
Tipo de resfriamento		Alterações de acrossoma*					Total
		0-5	6-10	11-15	16-20	21-35	
15° C	N <sup>o</sup>	40	6	1	0	1	<b>48</b>
	%	83,33	12,50	2,08	0,00	2,08	<b>100,00</b>
15° C / 5° C	N <sup>o</sup>	41	7	0	0	0	<b>48</b>
	%	85,42	14,58	0,00	0,00	0,00	<b>100,00</b>
5° C	N <sup>o</sup>	39	6	2	1	0	<b>48</b>
	%	81,25	12,50	4,17	2,08	0,00	<b>100,00</b>

\*Teste de Qui-quadrado (P>0,05).

As amostras de ejaculados apresentaram mais de 60% de frequência de alterações de cabeça dentro do limite aceitável para uma boa fertilização (5%). Para as alterações de peça intermediária, mais de 80% das amostras também apresentaram alterações dentro do limite.

Era esperado ocorrer um maior número de espermatozóides com alterações de acrossoma, no processo de resfriamento rápido (5° C), uma vez que os espermatozóides suínos são muito sensíveis ao estresse térmico. No entanto, mais de 80% das amostras de ejaculados apresentaram até cinco alterações. Pode-se concluir que o estresse causado pelo resfriamento não é suficiente para promover uma elevada taxa de alteração de acrossoma.

Para as alterações de cauda espermática, foi observado que, quando se utilizou o processo de resfriamento convencional (15° C), mais de 50% das amostras apresentaram alterações compatíveis para serem utilizadas para IA. No entanto, os processos de resfriamento lento (15° C/5° C) e o rápido (5° C) promoveram alterações expressivas na cauda espermática, sendo que em ambos somente 37,50% das amostras dos ejaculados apresentaram alterações na escala de 0-10.

Gadea (2005) afirma que a morfologia espermática é um parâmetro que está relacionado à fertilidade. Na análise espermática, esse parâmetro fornece informações sobre o “status” da espermatogênese, facilita a seleção de reprodutores para os programas de IA e, também, fornece informações complementares sobre estresse sofrido pelos reprodutores suínos durante sistemas intensivos de colheitas seminais.

O maior valor observado nas alterações morfológicas totais das amostras dos ejaculados ocorreu em decorrência da maior percentagem de gotas citoplasmáticas distais observadas nesses ejaculados. Segundo Silveira e Iais (1999), e Scheid (1993) as alterações de gota citoplasmática distal devem ser

desconsideradas por não representarem alterações na fertilidade do sêmen do suíno.

#### **4.4.2 Teste de integridade do acrossoma**

Os valores encontrados neste experimento das alterações dos acrossomas estão apresentados na Tabela 13. As avaliações da integridade dos acrossomas dos espermatozoides não foram significativas ( $P>0,05$ ), pelo teste de qui-quadrado para a variável nível de  $\text{CaCl}_2$ .

Neste experimento foram observados valores acima de 80% na escala de 90-100, para acrossomas íntegros, em ambos os períodos (6 e 30 horas), independentemente do nível de  $\text{CaCl}_2$  utilizado. Isto confirma mais uma vez que o  $\text{CaCl}_2$  não exerceu influência sobre a integridade de membrana espermática como verificado no teste de viabilidade espermática e TRO e nem sobre a membrana acrossômica como observado nesta avaliação.

Reprodutores com qualidade espermática similar, após a colheita, variam grandemente quanto à resistência, à conservação *in vitro* (período em que se mantém motilidade e a integridade do acrossoma ou período de viabilidade espermática). Mesmo perdendo a motilidade espermática o espermatozoide pode permanecer com o acrossoma íntegro. Animais com boa resistência à conservação apresentam valores de 50 a 60% de motilidade e 80% das células com acrossoma intacto, no quinto dia após a colheita (dia 1= dia da colheita), em diluentes como Kiew e BTS (Scheid, 1993). Neste experimento foi observado que, após 72 horas de armazenamento houve uma frequência de 50,69% (Tabela 4) das amostras de ejaculados, que apresentaram valores de 60-90% de motilidade espermática e uma frequência superior a 70% (Tabela 11) de amostras, que apresentaram acrossomas íntegros no terceiro dia após a colheita.



**TABELA 13.** Valores médios obtidos no teste de integridade de acrossoma, das amostras de ejaculados, nos diferentes níveis de CaCl<sub>2</sub>, 6 e 30 horas do início do armazenamento.

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Integridade de acrossoma (6 hs)*			Total
		50-70	71-90	91-100	
0	Nº	1	3	32	36
	%	2,78	8,33	88,89	100,00
2,5	Nº	0	3	33	36
	%	0,00	8,33	91,67	100,00
5,0	Nº	1	2	33	36
	%	2,78	5,56	91,67	100,00
7,5	Nº	0	4	32	36
	%	0,00	11,11	88,89	100,00

Níveis de CaCl <sub>2</sub> (mM)		Integridade de acrossoma (30 hs)*			Total
		40-70	71-90	91-100	
0	Nº	1	4	31	36
	%	2,78	11,11	86,11	100,00
2,5	Nº	0	3	33	36
	%	0,00	8,33	91,67	100,00
5,0	Nº	1	1	34	36
	%	2,78	2,78	94,44	100,00
7,5	Nº	0	4	32	36
	%	0,00	11,11	88,89	100,00

\*Teste de Qui-quadrado (P>0,05), 6 e 30 horas do início do armazenamento.

Métodos para avaliação *in vitro* da qualidade espermática como a integridade de acrossoma e o teste de viabilidade têm sido desenvolvidos com o objetivo de prever a capacidade fertilizante, embora nenhum método tenha provado ter uma alta correlação com a fertilidade (Woelders, 1990).

Diversos autores têm descrito que o elevado número de acrossomas alterados está relacionado aos problemas de fertilidade em suínos. Contudo, o coeficiente de correlação entre a integridade de acrossoma e a fertilidade não é alto (Gadea, 2005).

Os valores encontrados para o parâmetro de integridade de acrossoma quanto ao tipo de resfriamento a que as amostras de ejaculados foram submetidas, são apresentados na Tabela 14. Não houve significância ( $P>0,05$ ) pelo teste de qui-quadrado em função do tipo de resfriamento.

**TABELA 14.** Valores médios obtidos no teste de integridade de acrossoma, das amostras de ejaculados, nos diferentes tipos de resfriamento, 6 e 30 horas do início do armazenamento.

Tipo de resfriamento		Integridade de acrossoma (6 hs)*			Total
		50-70	71-90	91-100	
15° C	Nº	0	3	45	48
	%	0,00	6,25	93,75	100,00
15° C / 5° C	Nº	0	3	45	48
	%	0,00	6,25	93,75	100,00
5° C	Nº	2	6	40	48
	%	4,17	12,50	83,33	100,00

Tipo de resfriamento		Integridade de acrossoma (30 hs)*			Total
		40-70	71-90	91-100	
15° C	Nº	0	3	45	48
	%	0,00	6,25	93,75	100,00
15° C / 5° C	Nº	0	3	45	48
	%	0,00	6,25	93,75	100,00
5° C	Nº	2	6	40	48
	%	4,17	12,50	83,33	100,00

\*Teste de Qui-quadrado ( $P>0,05$ ), 6 e 30 horas do início do armazenamento.

Verificou-se que as amostras de ejaculados mantiveram uma frequência acima de 80% nas três temperaturas de resfriamento. Estes resultados confirmam mais uma vez que a avaliação da integridade de acrossoma é mais adequada para sêmen congelado, como também foi observado no teste anterior (morfologia espermática).

Esses resultados estão de acordo com Ortman & Martinez (1994), embora amplamente utilizado, o teste *in vitro* de integridade de acrossoma não fornece uma boa precisão na avaliação da capacidade fertilizante do sêmen resfriado. Esse teste é mais adequado para sêmen congelado.

Os testes *in vitro* amplamente utilizados para avaliação da qualidade espermática são associados basicamente a três características: viabilidade espermática, morfologia (estrutura) e funcionalidade dos espermatozoides. Os testes de função espermática *in vitro* são realizados para prever os resultados de inúmeros processos biológicos, incluindo eficiência do transporte espermático, velocidade do processo de capacitação espermática, habilidade do espermatozoide para ligar na superfície do oócito, o processo de reação acrossômica, a penetração na zona pelúcida e a fusão dos núcleos (Xu et al. 1998). Porém, esses testes são mais elaborados e consomem um maior período de tempo para avaliação da qualidade espermática.

#### **4.5 Avaliação do perfil enzimático**

Os resultados da análise de variância não mostraram efeito significativo ( $P>0,05$ ) para o perfil de AAT no plasma seminal. Os valores médios encontrados para a concentração de AAT, no presente trabalho são apresentados na Tabela 15. Neste estudo o estresse causado pelo resfriamento não foi suficiente para promover diferenças nos níveis de AAT liberados, para nenhuma das três variáveis analisadas (níveis de  $\text{CaCl}_2$ , tipo de resfriamento e período de

acondicionamento). Esta avaliação coincide com o teste de integridade de acrossoma, que também não foi influenciado pelos níveis de CaCl<sub>2</sub> e nem pelos processos de resfriamento aos quais os ejaculados foram submetidos. Isso mostra que, para sêmen resfriado, a avaliação do perfil enzimático não é um bom método para prever a qualidade espermática de um ejaculado.

**TABELA 15.** Valores médios para o perfil enzimático da AAT (UI/ml) de acordo com os níveis de CaCl<sub>2</sub>, tipos de resfriamento e durante o período de armazenamento das amostras de ejaculados.

<b>Níveis de CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Média*</b>
<b>0</b>	2,44 (0,19)
<b>2,5</b>	2,75 (0,19)
<b>5,0</b>	2,75 (0,19)
<b>7,5</b>	2,56 (0,19)
<b>Tipo de resfriamento</b>	<b>Média*</b>
<b>15° C</b>	2,55 (0,17)
<b>15° C/5° C</b>	2,70 (0,17)
<b>5° C</b>	2,64 (0,17)
<b>Período de armazenamento (horas)</b>	<b>Média*</b>
<b>0</b>	2,75 (0,17)
<b>24</b>	2,43 (0,17)
<b>48</b>	2,71 (0,17)

\* Não houve diferença significativa entre as médias (teste F).

Graham & Pace (1976) e Pursel et al. (1970) citados por Ciereszko et al. (1990), trabalhando com congelamento de sêmen suíno, mostraram que há uma saída mais intensa de AAT das células espermáticas depois que estas são

submetidas ao processo de congelamento, em relação àquelas que só processadas para resfriamento.

Borque & Ayllón (1996), trabalhando com sêmen de carneiros, submeteram os espermatozoides a um estresse mínimo (centrifugação da amostra de sêmen fresco) e estresse máximo (congelamento e descongelamento sucessivos), encontraram um efeito significativo ( $P < 0,01$ ) na atividade enzimática da AAT, depois que os ejaculados foram submetidos ao processo de estresse máximo. Estes autores observaram que a AAT aumenta no meio extracelular, quando o sêmen é armazenado em nitrogênio líquido. Isto mostra que para sêmen resfriado a validade dessa técnica é controversa. Quando as células espermáticas são danificadas, as membranas são inativadas ou destruídas e o material celular é perdido.

De acordo com Watson (1981), os espermatozoides suínos são muito sensíveis ao choque térmico. Após serem submetidos a um estresse sofrem perda de motilidade e integridade da membrana, aumentando a fluidez da membrana e havendo perdas de proteínas e de pequenas moléculas pelas células.

Ciereszko et al. (1992) realizaram uma pesquisa para avaliar a atividade enzimática da AAT no sêmen de reprodutores suínos, utilizando além do plasma seminal, fluídos da cauda do epidídimo e da vesícula seminal. Foi mostrado nesse estudo que a atividade da AAT no plasma seminal foi 48 vezes menor que a atividade no fluído da cauda do epidídimo e quatro vezes menor que a do fluído da vesícula seminal. Estes autores afirmaram que a atividade da AAT no plasma seminal é tão baixa que é impossível detectar a enzima pelo método de eletroforese.

Moreno et al. (2001) avaliaram a motilidade e vigor espermáticos e a dosagem de AAT no sêmen caprino diluído em leite desnatado e no diluente Fiser. Ao se proceder a dosagem de AAT, constatou-se diferença significativa

( $P < 0,05$ ) entre estes diluentes. No estudo, o sobrenadante do sêmen caprino diluído com Fiser apresentou menor concentração de AAT. Estes autores concluíram que os parâmetros motilidade e vigor espermáticos não devem ser os únicos critérios de avaliação espermática, contradizendo os resultados obtidos no presente experimento em que a avaliação do perfil enzimático da AAT não apresentou resultados significativos para sêmen suíno resfriado.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado pode-se concluir que:

1. o cloreto de cálcio só é capaz de manter a motilidade espermática.
2. o processo de resfriamento lento substitui o processo convencional sem afetar a qualidade do sêmen suíno.
3. a avaliação da AAT não é válida para sêmen resfriado suíno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.

BOOTMAN, M. P.; COLLINS, T. J.; PEPIATT, C. M.; PROTHERO, L. S.; MACKENZIE, L.; DE SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEYS, S. C.; SEO, J. T.; BERRIDGE, M. J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling – an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S.l.], v. 12, p. 3-10, 2001.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N. B.; O' FLAHERTY, C. M.; BECONI, M. T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 8, p. 2126-2135, May 2005.

BORQUE, C.; AYLLÓN, A. Aspartate aminotransferase in ejaculates of manchego and merino rans after minimal and maximal sperm damage. **Theriogenology**, Woburn, v. 46, n. 6, p. 1017-1025, Oct. 1996.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto alegre, v. 33, n. 1, p. 17-32, 2005.

CARVALHO, L. F. R.; SILVA FILHO, J. M. da. Avaliação andrológica do reprodutor suíno. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 36, p. 15-28, jan. 2001.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; STRZEZEK, J.; DEMIANOWICZ, W. Low stability of aspartate aminotransferase activity in boar semen. **Theriogenology**, Woburn, v. 37, n. 6, p. 1269-1281, June 1992.

CIERESZKO, A.; JABLONOWSKA, C.; STRZEZEK, J. Aspartate aminotransferase activity in motile and immotile spermatozoa fractions of frozen-thawed boar semen obtained after filtration on columns filled with chitin. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 237-244, Nov. 1990.



CORRÊA, M. N.; BIANCHI, I.; LUCIA JUNIOR., T.; SERRET, C. G.; BORDIGNON, J.; RAMBO, G.; DESCHAMPS, J. C. Efeito do sêmen acondicionado a 5° C com o diluente PIGPEL-5 sobre a taxa de penetração espermática *in vitro* de ovócitos vitrificados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., 2005. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: ABRAVES, 2005. p. 275-276.

CORRÊA, M.N.; VIVAN, J.C.; XAVIER, E.G.; ROLL, V.F.B.; CORRÊA, E.K.; DESCHAMPS, J.C. Manejo reprodutivo do reprodutor suíno. In: CORRÊA, M. N.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J. C.. (Org.). **Tópicos em Suinocultura**. Pelotas, 2000, v. 1, p. 123-148.

CUNNINGHAM, J. G. Fisiologia Reprodutiva do Reprodutor. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 39, p. 399-405.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; ISHIGAKI, T.; ESPINOSA, F. Íon channels in sperm physiology. **Physiological Review**, Bethesda, v. 79, n. 2, p. 481-510, Apr. 1999.

DAY, B. N. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 161-172, July 2000. Supplement.

ESTIENNE, M. J.; HARPER, A. F.; KNIGHT, J. W.; BARB, C. R.; RAMPACEK, G. B. Sexual behavior after treatment with prostaglandin-F<sub>2α</sub> in boars with suppressed concentrations of gonadal steroids. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1/2, p. 53-57, Nov. 2004.

ETCHES, R. J. **Reproducción Aviar**, Zaragoza: Acribia, 1996. 339 p.

FAO Database 2002. Disponível em: <<http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>>. Acesso em: 2006.

FLOWERS, W. L. Semen evaluation, extension, packaging and transport methods. In: ANUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996, Nashville. **Proceedings...** Nashville: American Association of Swine Practitioners, 1996. p.469-479.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1992. 79 p.

FOXCROFT, G.R. Melhorando os resultados da inseminação artificial e monta natural. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, Brasil. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2002. p. 25-37.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10° C. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 6, p. 1605-1616, Apr. 2005.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 2, p. 431-444, Jan. 2005.

GERRITS, R. J.; LUNNEY, J. K.; JOHNSON, L. A.; PURSEL, V. G.; KRAELING, R. R.; ROHRER, G. A.; DOBRINSKY, J. R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 2, p. 283-299, Jan. 2005.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1232 p.

GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; McMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de equino, após o resfriamento a 5° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 112-122, jan./fev. 2004.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinic North American Equine Practice**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 131-147, Apr. 1996.

GROSSFELD, R.; KLINC, P.; SIEG, B.; RATH, D. Production of pligets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 8, p. 2269-2277, May 2005.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, 7. ed. São Paulo: Manole, 2003. 530 p.

HOLT, W. V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L. M.; WATSON, P. F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 2, p. 370-382, Jan. 2005.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, London, v. 62, n. 1/3, p. 3-22, Aug. 2000.

HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; LEE, W. C.; TSOU, H. L.; LEE, Y. P.; CHANG, H. L.; WU, J. J.; YANG, P. C. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 51, n. 5, p. 1007-1016, Apr. 1999.

JANIS, R.A.; SILVER, P.J.; TRIGGLE, D.J. Drug action and cellular calcium regulation. **Advances in Drug Research**, San Diego, v. 16, p. 309-591, 1987.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction & Fertility**, Chicago, v.70, n. 1, p. 219-228, Jan. 1984.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 143-172, Aug. 2000.

KING, G. I.; MACPHERSON, I. W. A comparison of two methods for boar semen collection. **Journal of Animal Science**, Chamapign, v. 36, n. 4, p. 563-565, Apr. 1973.

LANE, M.; BAVISTER, B.D. Calcium homeostase in early hamster preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 59, n. 4, p. 1000-1007, Oct. 1998.

MARTIN RILLO, S. MARTINEZ, E. GARCIA ARTIGA, C. DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 31, n. 3, p. 519-526, Sept. 1996.

MARTINEZ, E. A.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; CUELLO, C.; GIL, M. A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.L. An update on reproductive technologies with potencial short-term application in pig production. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 40, p. 300-309, 2005.

MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. LUCAS, X.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.L. Inseminação artificial intra-uterina. **Suínos & Cia**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 46-49, nov./dez. 2002.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**, Porto Alegre: Sulina, 1982. v. 5, 380 p.

MORENO, F. A. B.; BISPO, C. A. S.; GUERRA, M. M. P.; TENÓRIO FILHO, F.; OLIVEIRA, R. R.; ALVES, L. C.; WISCHRAL, A. Motilidade, vigor e dosagem de Aspartato Amino Transferase no sêmen caprino diluído em leite desnatado e Fiser. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 3, p. 434-435, 2001.

MURGAS, L. D. S.; ZANGERÔNIMO, M. G.; SANTOS, A. G. O.; OLIVEIRA, S. L. Oxitocina no sêmen suíno heterospérmico resfriado a 15° C. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 3, n. 2, p. 33-40, jul./dez. 2002.

MURGAS, L. D. S. **Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com rações suplementadas com óleo de soja como fonte de ácidos graxos**. 1999. 111 p. (Tese de Doutorado em Nutrição Animal- Monogástricos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NISHIMURA, K. Effects of calcium íons on the malate-aspartate shuttle in slow-cooled boar spermatozoa. **Biology Reproduction**, Madison, v. 49, n. 3, p. 537-543, Sept. 1993.

OLIVEIRA, S. L. **Qualidade do sêmen de varrões alimentados com rações contendo diferentes tipos de óleo**. 2004. 74 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrana damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v. 41, n. 1, p. 37-47, 1994.

PETRUNKINA, A. M.; GRÖPPER, B.; TÖPFER-PETERSEN, E.; GÜNZEL-APEL, A. R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 5, p. 1390-1406, Mar. 2005.

PORKWORLD: A Revista do Suinocultor Moderno. Paulínia: Animal World, n. 28, set./out. 2005. p. 7.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 36-45, Feb. 2004.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; GERRITS, R. J. Glutamic-oxaloacetic transaminase and lactic dehydrogenase activities of boar spermatozoa and seminal plasma. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 176, 1969.

REIS, F. T. Colheita, avaliação e manipulação do ejaculado de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 3, p. 22-29, 1997.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. **American Journal Clinical Pathology**, Chicago, v. 28, n. 1, p.56-63, 1957.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 2, p. 514-535, Jan. 2005.

ROMERO, C. de A.; FALCETO, M. V. Controle da reprodução do cachaço. **Suis**, Paulínia, n. 6, p. 10-21, set. 2005.

RONER, M. N. B.; PALHARES, M. S.; SILVA FILHO, J. M.; NASCIMENTO, E. F.; RUFINO, L. M.; SANTOS, A. D. Avaliação do sêmen suíno armazenado a 17° C e a 5° C, através do teste hiposmótico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., 2005, Fortaleza. **Anais...Fortaleza: ABRAVES**, 2005, p. 275-276.

SAS. SAS/STAT Software. **Guide for personal computers**. Cary, New York, 1995.

SCHEID, I. R.; SILVEIRA, P. R. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. **Suínos & Cia**, Campinas, p. 25-28, nov./dez. 2002.

SCHEID, I. R. **Manual de inseminação artificial de suínos**: procedimentos e métodos no laboratório. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 1993. 48 p.

SCHEID, I. R. Avaliação da capacidade reprodutiva do reprodutor suíno. In: SIMPOSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 1984. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1984. p.91-105.

SILVA, E. F. da. Treinamento de reprodutores para centrais de inseminação e monta natural. **Porkworld**, Paulínia, v. 2, n. 15, p. 48-50, set/out. 2003.

SILVEIRA, P. R.; IAIS, I. **Curso de Inseminação Artificial em Suínos**. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 1999. 19 p.

SILVEIRA, P. R.; SCHEID, I. R. Qualidade de sêmen no processo de inseminação artificial. **Suinocultura Industrial**, Porto Feliz, v. 25, n. 171, n. 6, p. 33-38, 2003.

SONE, M.; CHIKYU, M.; YOSHIDA, M. et al. Storage of boar semen in: liquid form. **Japanese Journal Swine Science**, Tokyo, v. 29, n. 1, p. 41-50, 1992.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos reprodutivos do reprodutor. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, cap. 35, p. 603-614.

SUAREZ, S. S.; HO, H. C. Hyperactivation of mammalian sperm. **Cellular and Molecular Biology**, Nois de Grand, v. 49, n. 3, p. 351-356, May 2003.

TARDIF, S.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, Woburn, v. 52, n. 3, p. 447-459, Aug. 1999.

TONIOLLI, R.; COMBARNOUS, Y. Adição de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ao diluidor do sêmen do reprodutor: efeito sobre a motilidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 1, p. 33-40, jan./mar. 1999.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M. da. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 36, p. 45-53, jan. 2001.

WATSON, P. F. The effect of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.). **Effect of Low Temperatures on Biological Membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189-218.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **The Veterinary Quarterly**, Utrecht, v. 19, n. 3, p. 135-138, Sept. 1997.

WOELDERS, H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 1, p.145-164, 1990.

XU, X. j.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTO, W.; FOXCROFT, G. R. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 12, p-3079-3089, Dec. 1998.

YAVETZ, H.; HAUSER, R.; YOGEV, L. et al. Advanced methods for evaluation of sperm quality. **Andrologia**, Washington, v. 27, n. 1, p. 31-35, 1995.

## ANEXOS

ANEXO A	Pág.
<b>TABELA 1A.</b> Resumo da análise de variância do perfil enzimático da AAT nas amostras de ejaculados. ....	<b>69</b>

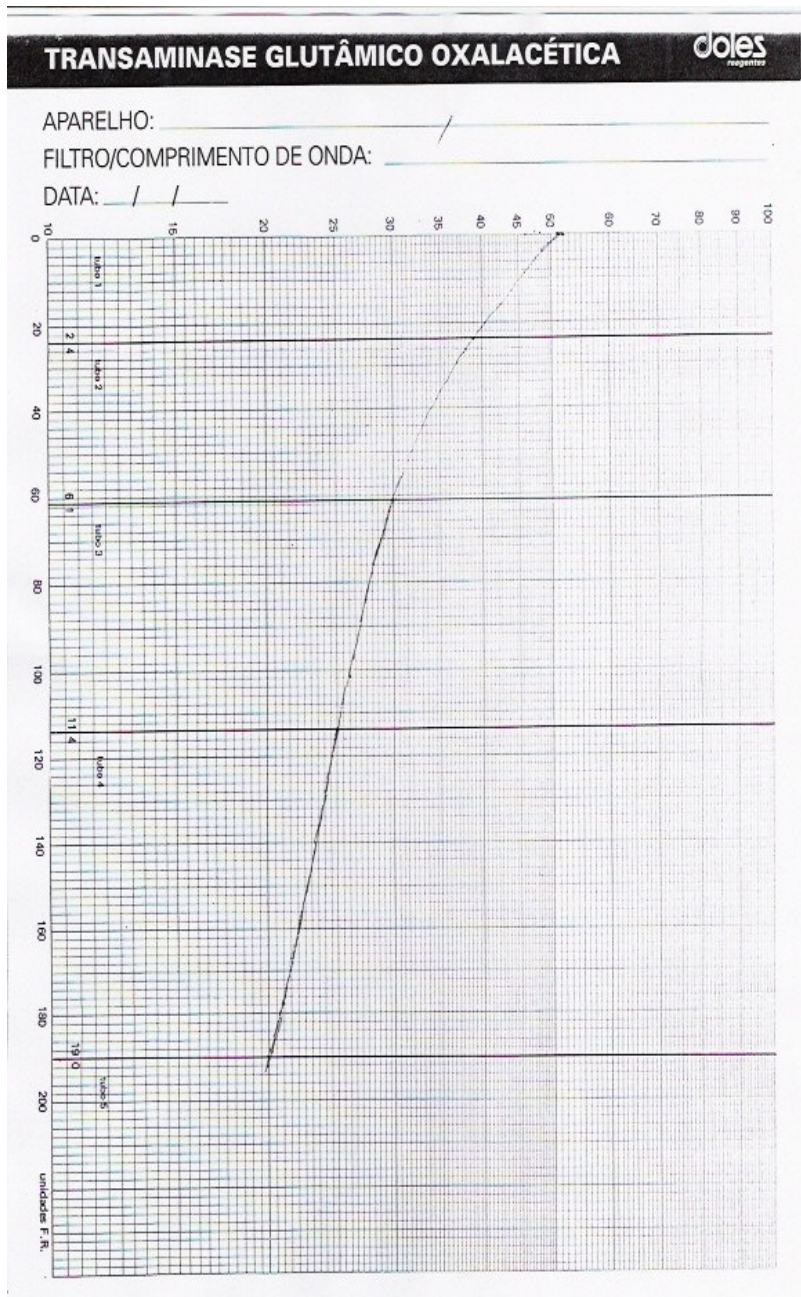


**TABELA 1A.** Resumo da análise de variância do perfil enzimático da AAT nas amostras de ejaculados suíno.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr &gt; F</b>
CaCl <sub>2</sub>	3	0,63	0,59 <sup>NS</sup>
Temperatura (TR)	2	0,19	0,82 <sup>NS</sup>
Tempo de armazenamento (TP)	2	1,08	0,34 <sup>NS</sup>
CaCl <sub>2</sub> * TR	6	0,15	0,98 <sup>NS</sup>
CaCl <sub>2</sub> * TP	6	1,04	0,40 <sup>NS</sup>
TR * TP	4	0,68	0,60 <sup>NS</sup>
CaCl <sub>2</sub> * TR * TP	12	0,23	0,99 <sup>NS</sup>
<b>CV (%)</b>		<b>38,13</b>	

P > 0,05= NS – não significativo

<b>ANEXO B</b>	<b>Pág.</b>
<b>FIGURA 1B.</b> Curva de calibração para o cálculo dos resultados do perfil enzimático da AAT. ....	<b>71</b>



**FIGURA 1B.** Curva de calibração para o cálculo dos resultados do perfil enzimático