



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu
tajacu* Linnaeus, 1758) EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA
DE COCO EM PÓ (ACP-116C®)**

MARIANA DE ARAÚJO DA SILVA

Médica Veterinária

MOSSORÓ – RN-BRASIL
Dezembro-2011

MARIANA DE ARAÚJO DA SILVA

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-116C®)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

MOSSORÓ- RN- BRASIL

Dezembro – 2011

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

S586e Silva, Mariana de Araújo Da.

Um estudo sobre a Crio preservação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu* Liannaeus, 1758) em diluente á base de Água de coco em pó (ACP 116c) / Mariana de Araújo da Silva -- Mossoró, 2011.

124f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. Área de Concentração: Produção e Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Profº. D.Sc. Alexandre Rodrigues Silva

1. *Tayassu tajacu*. 2. Criopreservação. 3. Água de coco em pó. 4. Sêmen. I.Título.

CDD: 636.089

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

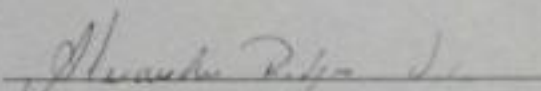
MARIANA DE ARAÚJO DA SILVA

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP®116C)

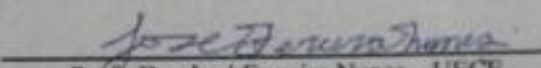
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

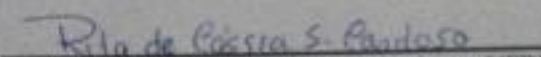
APROVADA EM 16 DE DEZEMBRO DE 2011

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva-UFERSA
Orientador


Prof.^a Dr.^a Lúcia Daniel Machado da Silva-UECE
Primeiro Conselheiro


Prof. Dr. José Ferreira Nunes – UECE
Segundo Conselheiro


Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Soares Cardoso - UFRPE
Terceiro Conselheiro

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA DE ARAÚJO DA SILVA – Nascida em Araçatuba-SP no dia 27/02/1987, filha de Gilberto Mariano Lopes da Silva e Ivaneide Miguel de Araújo Silva, concluiu o ensino fundamental no Complexo Educacional Santo André (CESA), de Assú-RN e o ensino médio no Centro Federal de Educação Tecnológica (CEFET), de Mossoró – RN, em 2004.2. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) em 2009.2, onde foi bolsista de PIBIC no período de um ano. Durante a graduação desenvolveu trabalhos na área de Microbiologia e Saúde Pública, estudando a ação de fungos entomopatogênicos sobre o *Lutzomyia longipalpis*, e realizou estágios na área de clínica médica de pequenos animais. Foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA em dezembro de 2009. Durante o período de mestrado colaborou na disciplina de Fisiopatologia da Reprodução Animal do curso de Medicina Veterinária da UFERSA, e foi aluna de mestrado-sanduiche da Universidade Federal de Minas Gerais no período de março á julho, e agosto á novembro de 2011.

À minha família. Por acreditarem sempre em mim, me entenderem e me incentivarem. Pela força, paciência e orgulho.

Dedico

"Jesus não decepciona nossa esperança.....

E se alegra com nossa confiança."

Pe. Ricardo (Diocese de
Santa Luzia – Mossoró/RN)

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus, por nunca ter me faltado, e a Nossa Senhora, sempre presente nas orações da minha mãe, para me guiar e me proteger.

Meus pais, Gilberto Lopes e Ivaneide Miguel, por todo amor, e paciência, diante das minhas crises, chatices e decisões. Ao meu irmão, Gilberto Jr., por toda ajuda. Á minha cadela Sophia e minha “ex-gata” Mica, pela alegria, carinho e amor sempre disponíveis.

Aos integrantes do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, primeiro pela amizade, por serem parte da minha família, e depois pela ajuda na realização desse trabalho, principalmente Gabriela Liberalino, pois descobri uma amiga, que contribuiu bastante para que a conclusão desse trabalho fosse possível, e que me ajudou em momentos importantes da minha vida pessoal, e a Artur Brilhante e Livia Campos, sempre disponíveis nas emergências, e pelos quais desenvolvi um enorme carinho. Ao meu sempre presente orientador, Alexandre Rodrigues Silva, por demonstrar confiança em mim, e me fazer ter paixão pela pesquisa, e me guiar para melhor desenvolvê-la, obrigado por tudo.

As minhas “amigas-irmãs” (Ana íris Batista, Janine Bulhões, Jeanyara Letiere, Tatiana Porpino e Windleyanne Bezerra), por mesmo agora longe de mim, sempre se preocuparem comigo e continuarem presentes. A Laerte Amorim, pelos conselhos. E aos meus amigos Samyra Nassif, Paulo Almeida, Guilherme Costa e Gleide Avelar, pelos ensinamentos, acolhida e amizade durante minha permanência na UFMG.

Aos mestres (doutores), Sidney Sakamoto e Jean Berg, pela atenção dispensada, sempre prontos a ajudar. Moacir Franco, pelo carinho de sempre. Marc Henry e Luiz Renato de França, pelo conhecimento adquirido e oportunidade dada.

Ao Centro Nacional de Pesquisa – CNPq, por financiar este trabalho. Ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS, pelo fornecimento dos animais, bem como ao Sr. Almeida, pela ajuda dispensada. E aos membros da banca, por aceitarem gentilmente este convite, e contribuírem com o aperfeiçoamento do presente estudo.

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-116C ®)

SILVA, M. A. Criopreservação do sêmen de catetos (*tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) em diluente à base de água de coco em pó (ACP). 2011. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2011.

RESUMO- Esse estudo teve como objetivo testar o uso da água de coco em pó (ACP-116C ®) como diluente na criopreservação de sêmen de catetos, acrescido de diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol, bem como, buscar elaborar um protocolo de criopreservação, testando-se diferentes curvas de congelamento, volumes de palheta para armazenamento e temperaturas de descongelamento. No primeiro experimento, os ejaculados de doze animais foram fracionados em alíquotas que foram diluídas em Tris acrescido de 10% gema de ovo e 3% de glicerol ou em ACP-116C ® adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo (10 ou 20%) e glicerol (1,5 e 3%), acondicionadas em nitrogênio líquido e descongeladas após um mês a 37°C por um minuto, e seus parâmetros seminais foram posteriormente avaliados para a motilidade espermática, vigor, viabilidade, morfologia e integridade da membrana acrossômica e funcional, onde verificou-se que ACP-116C ® acrescido de 20% gema de ovo e 3% de glicerol, proporcionou melhores resultados de motilidade e vigor após a descongelamento do que quando comparado com diluente Tris ($p < 0,05$). No segundo experimento, utilizou-se o ACP-116C ® acrescido de 20% gema de ovo e 3% de glicerol como diluente. Após a diluição as amostras foram divididas em duas alíquotas, destinadas a diferentes curvas de congelamento, curva lenta (A) e curva rápida (B). As amostras foram acondicionadas em palhetas de 0,25 e 0,5mL, durante uma semana, e descongeladas a 37°C/1min e 70°C/8s, e avaliadas como no experimento anterior. Não foram verificadas diferenças entre as curvas de congelamento e volumes de palheta ($p > 0,05$). Porém, foram verificadas diferenças entre o volume das palhetas e a taxa de descongelamento a 70 °C/8s ($p < 0,05$). Em conclusão, recomenda-se a criopreservação do sêmen de cateto em ACP®-116C, acrescido de 20% de gema de ovo e 3% de glicerol, usando a curva de congelamento rápida (B) que permite a maximização do tempo durante o processo, o armazenamento das amostras em palhetas de 0,25 ou 0,5mL, e descongelamento a 37°C/60s.

Palavras-Chave: cateto, *Tayassu tajacu*, criopreservação, água de coco em pó, curva de congelamento, palhetas, descongelamento.

CRYOPRESERVATION OF SEMEN COLLARED PECCARY (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) EXTENDER IN POWDERED COCONUT WATER (ACP)

SILVA, M. A. Cryopreservation of semen collared peccary (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) extender in powered coconut water (ACP). 2011. 119p. Thesis (Master's degree In Animal Science: Animal Production and Reproduction) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2011.

ABSTRACT – This study aimed to test the use of powdered coconut water (ACP ®-116C) based extender in the cryopreservation of semen collared peccary, plus different concentrations of egg yolk and glycerol, as well as seeking to draw up a protocol of cryopreservation by testing different freezing curves, volumes straws for storage and post-thawing temperatures. In the first experiment, ejaculates from twelve animals were fractionated into aliquots that were diluted in Tris plus 10% egg yolk and 3% glycerol or ACP-116C ® added different concentrations of egg yolk (10 or 20%) and glycerol (1.5 and 3%), placed in liquid nitrogen and thawed after a month at 37 ° C for one minute, and their semen parameters were further evaluated for sperm motility, vigor, viability, morphology and acrosome membrane integrity and functional, place showed that ACP-116C ® plus 20% egg yolk and 3% glycerol, showed the best motility and vigor after thawing than when compared with Tris diluent ($p < 0.05$). In the second experiment, we used the ACP-116C ® plus 20% egg yolk and 3% glycerol. After dilution the samples were divided into two aliquots, to different freezing curves freezing, slow curve (A) and fast curve (B) . The samples were packed in straws of 0.25 and 0.5ml for a week, and thawed at 37°C/ 1 min and 70°C/8s, and evaluated as in the previous experiment. There were no differences between the curves and volumes straws post thawing ($p > 0.05$). However, differences were observed between the volume straws and the rate of thawing at 70°C/8s ($p < 0.05$). In conclusion, we recommend cryopreservation of collared peccary semen from ACP ® 116C plus 20% of egg yolk and 3% glycerol, using the fast curve freezing , which allows maximizing the time during the process, storage of samples in straws of 0.25 or 0.5 mL, and thawing at 37°C/60s.

Keywords: collared peccary, *Tayassu tajacu*, cryopreservation, powdered coconut water, curve freezing, straws, thawing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus Celsius
'	Minutos
µL	Microlitros
Mm	Micrômetros
ACP	Água de coco em pó
CEMAS	Centro de Manipulação de Animais Silvestres
CFDA	6-diacetato de carboxifluoresceína
CITES	Convenção Internacional sobre o Tráfico de Espécies Silvestres
g	Grama
h	Hora
Kg	Quilogramss
IAA	Ácido 3-indol-acético
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IP	Iodeto de propídio
IUCN	International Union for Conservationof Nature
l	Litro
LDL	Low-Density Lipoprotein
M	Metro
Min	Minuto
mL	Mililitros
mOsm	Miliosmole
N ₂	Nitrogênio líquido
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundos
S	South
V	Volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características do ejaculado fresco de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) coletados por eletroejaculação. (N = 12 ejaculados).....	67
Tabela 2: Valores de Média $\pm$ DP da motilidade espermática e vigor do semen fresco, diluído e glicerolizado do semen (n=12) de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) usando diluente a base de Tris (grupo controle) e água de coco em pó (ACP-116c [®]) adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo (GE) e glicerol (GL).....	68
Tabela 3: Características pós-descongelação do semen de catetos (N=12), diluído em Tris (grupo controle) ou em água de coco em pó (ACP-116c [®]) adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo (GO) e glicerol (GL).....	69
Tabela 4: Características espermáticas do sêmen fresco de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) coletado por eletroejaculação. (n = 12 ejaculados).....	88
Tabela 5: Média $\pm$ DP da motilidade espermática e vigor do semen fresco, diluído e glicerolizado de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>), em diluente ACP-116c [®] (n=12), usando procedimento de congelção curto e longo.....	89
Tabela 6: Carcterísticas pós-descongelção do semen de catetos (n=12), diluído em água de coco em pó (ACP-116c [®]) submetido a diferentes curvas de congelção (A - control- and B), volumes de palheta (0.25- and 0.5-ml) e temperaturas de descongelção (37°C/60 s e 70°C/8 s).....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cateto (<i>Tayassu tajacu</i>). Fonte: www.corbis.com.br	18
Figura 2: Aspecto do testículo de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>). Fonte: Arquivo pessoal.....	23
Figura 3: Espermatozóide de cateto corado com azul de bromofenol. Fonte: Arquivo pessoal.....	38
Figura 4: Espermatozóide de cateto corado com iodeto de propídio e carboxifluoresceína.....	39
Figura 5: Espermatozóide de cateto corado com rosa bengala apresentando defeito morfológico de cauda enrolada (seta). Fote: Sousa, 2010.....	40

SUMÁRIO

Página

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.2.1 ASPECTOS GERAIS DOS CATETOS (<i>Tayassu tajacu</i>).....	18
1.2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CATETOS.....	21
1.2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN.....	23
1.2.3.1 DILUENTES.....	23
1.2.3.1.1 Tris.....	24
1.2.3.1.2 Água de coco em pó.....	25
1.2.3.2 CRIOPROTETORES.....	27
1.2.3.2.1 Glicerol.....	28
1.2.3.2.2 Gema de ovo.....	29
1.2.3.3 CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN.....	31
1.2.4 AVALIAÇÃO DE SÊMEN.....	34
1.2.4.1 Motilidade e vigor.....	35
1.2.4.2 Concentração espermática.....	35
1.2.4.3 Teste hiposmótico.....	35
1.2.4.4 Viabilidade espermática.....	37
1.2.4.5 Uso de sondas fluorescentes.....	38
1.2.4.6 Avaliação da morfologia espermática.....	39
1.2.5 JUSTIFICATIVA.....	42
1.2.6 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	43
1.2.7 OBJETIVOS.....	44
1.2.7.1 Geral.....	44
1.2.7.2 Específicos.....	44
1.2.8 REFERÊNCIAS.....	45
 2 CAPÍTULO 2 - CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (<i>Tayassu tajacu</i>) USANDO DILUENTE A BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-116C ®) ACRESCIDO DE GEMA DE OVO E GLICEROL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	 58
2.1 RESUMO.....	59
2.2 INTRODUÇÃO.....	60
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
2.3.1 Animais.....	62
2.3.2 Anestesia.....	62
2.3.3 Coleta de sêmen.....	63
2.3.4 Avaliação de sêmen.....	63
2.3.5 Diluentes e procedimentos de congelação e descongelação.....	64
2.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides após a descongelação.....	65
2.3.7 Análise estatística.....	65
2.4 RESULTADOS.....	66
2.4.1 Sêmen fresco e diluído.....	66
2.4.2 Características espermáticas após a descongelação.....	66
2.5 DISCUSSÃO.....	70
2.6 REFERÊNCIAS.....	73

3 CAPÍTULO 3 - INTERAÇÕES ENTRE AS TAXAS DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO E TAMANHO DE PALHETA SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (<i>Tayassu tajacu</i>).....	79
3.1 RESUMO.....	80
3.2 INTRODUÇÃO.....	81
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
3.3.1 Animais.....	83
3.3.2 Anestesia.....	83
3.3.3 Coleta de sêmen.....	84
3.3.4 Avaliação de sêmen.....	84
3.3.5 Diluentes e procedimentos de congelação e descongelação.....	85
3.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides após a descongelação.....	86
2.3.7 Análise estatística.....	86
3.4 RESULTADOS.....	87
3.5 DISCUSSÃO.....	91
3.6 REFERÊNCIAS.....	95
4 PERSPECTIVAS.....	103
ANEXOS.....	104
ANEXO 01 - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “CRYOPRESERVATION OF COLLARED PECCARIES (<i>TAYASSU TAJACU</i>) SEMEN USING A POWDERED COCONUT WATER (ACP-116C [®]) BASED EXTENDER PLUS DIFFERENT EGG YOLK AND GLYCEROL CONCENTRATIONS” À REVISTA <i>THERIOGENOLOGY</i>	104
ANEXO 02 - CRYOPRESERVATION OF COLLARED PECCARIES (<i>TAYASSU TAJACU</i>) SEMEN USING A POWDERED COCONUT WATER (ACP-116C [®]) BASED EXTENDER PLUS DIFFERENT EGG YOLK AND GLYCEROL CONCENTRATIONS.....	105

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O avanço da ocupação do ambiente pelo homem ocorre, em graus variáveis, devido ao aumento populacional e a consequente demanda por recursos naturais (BAMBERG et al., 1991). Da mesma forma em que se dá este crescimento, também ocorre a utilização dos recursos naturais, levando à destruição de inúmeros ecossistemas (BROWN et al., 1994). Entre as várias consequências desta ação, têm-se a perda ou a fragmentação do habitat de inúmeras espécies animais, resultantes de atividades humanas que, juntamente com a caça predatória, constituem as maiores ameaças aos mamíferos terrestres no Brasil (COSTA et al., 2005). Estes fatores tornaram-se ameaças concretas para várias espécies, como os catetos (*Tayassu tajacu*).

Nas últimas décadas, estudos relacionados à biotecnologia reprodutiva aplicada a diferentes espécies silvestres têm permitido avanços científicos significativos, contribuindo para a conservação da biodiversidade (HOLT; PICARD, 1999). Dentre as diferentes técnicas reprodutivas, tem-se destacado a criopreservação de sêmen que possibilita um melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, bem como, mesmo após a morte do animal, facilita a propagação deste material genético para diferentes regiões do planeta (CONCANNON; BATTISTA, 1989).

Para tanto, se faz necessário o emprego de diluentes, que são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos efeitos críticos da criopreservação. A água de coco como diluente de sêmen tem sido utilizada com frequência em granjas suínolas da Região Nordeste do Brasil (TONIOLLI et al., 1998) mostrando efeitos benéficos evidenciados *in vitro* sobre as características da motilidade espermática e, *in vivo*, sobre os parâmetros da fertilidade (TONIOLLI et al., 1997). Atua como uma solução estéril, contendo sais, proteínas, açúcares, vitaminas, minerais, fatores de crescimento e gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, fornecendo, desta forma, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência dos gametas masculinos criopreservados.

Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores, dentre elas a gema de ovo e o glicerol. A gema de ovo de galinha protege a membrana plasmática da célula espermática, restaurando fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento do sêmen (HAMMERSTEDT et al., 1990). Já o glicerol interage com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, baixando a temperatura de transição de fase dos lipídios da membrana e diminuindo assim, a adesão entre as células (KUNDU et al., 2000).

Considerando-se a condição de espécie silvestre ameaçada de extinção, estudos acerca de parâmetros reprodutivos dos catetos e uma possível implantação de bancos de sêmen, viriam contribuir não apenas para a preservação da espécie, mas também na aquisição de conhecimentos acerca do seu uso como uma alternativa a ser explorada na produção animal. Dessa forma, justifica-se a realização deste trabalho visa estabelecer um protocolo de criopreservação para o sêmen de catetos, utilizando-se o diluente à base de água de coco em pó (ACP) acrescido de diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol, como alternativa para o bioprocessamento de sêmen especialmente de animais ameaçados de extinção.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 ASPECTOS GERAIS DOS CATETOS (*Tayassu tajacu*)

O cateto (*Tayassu tajacu* Linneaus, 1758) (Figura 1) pertence ao reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, ordem dos Artiodáctilos, subordem Suiforme, família dos Tayassuídeos e gênero *Tayassu*. Os catetos podem ser encontrados do Arizona (Estados Unidos) à Argentina, podendo utilizar variados habitats, incluindo florestas úmidas, xerófilas e desertos (EISENBERG ; REDFORD, 1999). No Brasil, ocorrem duas espécies de taiassuídeos: *Tayassu tajacu*, conhecida como cateto, e *Tayassu pecari*, conhecida como queixada. O mais comum e mais amplamente difundido, o cateto (*T. tajacu*), habita as regiões desérticas, as estepes áridas e as florestas baixas (FILHO, 2005). Em território brasileiro estes animais ocorrem em todos os tipos de ambientes com relações de simpatria com queixadas e com o porco-monteiro, *Sus scrofa*, no Pantanal mato-grossense (SICURO; OLIVEIRA, 2002)



Figura 1. Cateto (*Tayassu tajacu*). Fonte: www.corbis.com.br

A família Tayassuidae é constituída pelos artiodáctilos pequenos. Possuem quatro dígitos no membro torácico e três no membro pélvico, orelhas e olhos pequenos, nariz em forma de tromba, cauda muito curta, corpo cobertos por pêlos grosseiros, membros proporcionalmente delgados em contraste com o corpo robusto e dentes

caninos superiores relativamente pequenos, pontudos cortantes e dirigidos para baixo (SICURO; OLIVEIRA, 2002).

Várias características anatômicas os tornam diferentes dos suínos, tais como a presença de uma cauda vestigial, a ausência de vesícula biliar e a presença de um estômago compartimentalizado em estômago glandular, bolsa gástrica e dois sacos “cegos” (SOWLS, 1997). São animais de pequeno porte. Quando adultos, medem de 75 a 100 cm de comprimento e aproximadamente 45 cm de altura, com o peso variando de 14 a 30 kg. Seus pelos são longos e ásperos, geralmente pretos com anéis brancos, o que confere aos animais uma pelagem acinzentada. Em seu dorso, existe uma crina erétil composta por pelos que tendem a ser mais escuros; na região do pescoço, destaca-se uma faixa de pelos brancos, conferindo um aspecto de colar (SOWLS, 1997). A pelagem do dorso é constituída por cerdas resistentes e que, possivelmente, funcionam como elemento de termorregulação e proteção externa, pois evitam lesões na pele quando o animal abre espaço entre a vegetação (FOWLER; MILLER, 2003). Entre a visão, o olfato e a audição, a visão é o sentido menos desenvolvido no cateto. Os olhos são pequenos, assim como o campo visual. O olfato é o mais desenvolvido e é usado para encontrar raízes e bulbos a uma profundidade superior a 0,5 m (SIMPSON, 1984). Vivem aproximadamente 15 anos na natureza e em cativeiro até 24 anos. (MENA et al., 2000). A glândula de cheiro, localizada na região dorsal, produz uma substância oleaginosa de forte odor, que é utilizada em contextos sociais e não sociais, como exemplo, quando é esfregada em árvores e outros objetos para a marcação territorial. Os machos geralmente são maiores que as fêmeas (NOWAK; PARADISO, 1983).

São animais gregários que vivem em grupos que variam de 5 a 50 indivíduos (JUDAS ; HENRY, 1999) e a manada é definida como uma unidade social permanente, onde todos os indivíduos movimentam-se, alimentam-se e dormem juntos (SOWLS, 1997). Em ambiente natural e em cativeiro, nas regiões tropicais, estes animais tem uma atividade predominantemente diurna (JUDAS; HENRY, 1999). Byers e Bekoff (1981) relatam a pouca ocorrência de interações agressivas, demonstrando comportamento social coeso, amigável e cooperativo. Em geral, são bastante sedentários e moram em moitas serradas abrigando-se por vezes em fendas ou troncos ocos de árvores. São em sua maioria onívoros, e consomem principalmente itens de origem vegetal e complementam sua dieta com pequenos invertebrados (SANTOS et al., 2000).

Os catetos produzem carne e couro de excelente qualidade, para os quais existe grande demanda, principalmente internacional (COSTA et al, 2005). A caça predatória do cateto tem representado, ao longo dos tempos, uma importante fonte de recurso alimentar. Atualmente, esses animais estão sendo criados em cativeiro com objetivos econômicos, podendo representar uma importante forma de desenvolvimento sustentável (CRUZ et al., 2009). Estão entre as espécies mais caçadas devido ao interesse comercial em sua carne e couro (VEIGA et al., 1995). Em razão dessa procura, o cateto está classificado no Anexo II da Convenção Internacional sobre o Tráfico de Espécies Silvestres (CITES), do qual o Brasil é signatário. Neste anexo, estão incluídas espécies que, apesar de não estarem em perigo de extinção, podem chegar a essa condição caso continuem a caça e o comércio de forma descontrolada (DE SOUZA-MAZUREK et al., 2000). Além disso, seis espécies de mamíferos com casco (ungulados) estão vulneráveis à extinção no Brasil, do total de espécies, os taiassuídeos (porcos-do-mato, catetos, queixadas) enfrentam situação ainda mais grave, com extinção em algumas regiões e espécies criticamente ameaçadas nos biomas Caatinga e Mata Atlântica (ICMBio, 2011).

Justamente por apresentar rusticidade e potencial de produção (SANTOS, 2009), os catetos podem ser explorados racionalmente através de um plano de manejo que favoreça a sua sobrevivência no seu hábitat natural. Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas de criação é uma atividade que serve como diversificação e integração das atividades agropecuárias, contribuindo para uma melhor exploração (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA 2000). Assim, viabilizar a abertura dos criatórios comerciais pode contribuir de forma decisiva na conservação ambiental, pois pode ser considerada como uma estratégia de conservação da espécie, ameaçada pela caça comercial ilegal e pela destruição de seu hábitat (SANTOS, 2004a). Além disso, provoca menores danos ao ambiente e surge como uma solução para o aproveitamento das áreas improdutivas de propriedades rurais, uma vez que se trata de uma espécie já adaptada (NOGUEIRA FILHO, CUNHA-NOGUEIRA; TAKECHI, 1999).

O manejo produtivo em cativeiro do *Tayassu tajacu* necessita ser aprimorado através de pesquisas básicas relacionadas a sua reprodução, sanidade, comportamento e nutrição (ALBUQUERQUE et al., 2011; VENTURIERI; LE PENDU, 2006). Além disso, são necessárias informações acerca de sua biologia reprodutiva, principalmente em machos (COSTA; PAULA, 2005; SOUZA et al, 2009; CASTELO et al., 2010).

Na região semi-árida do Brasil, a Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, sediada em Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, junto ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), registrado no IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912, existem, aproximadamente, 200 catetos (*Tayassu tajacu*). Atualmente, diversos trabalhos estão sendo realizados, contribuindo para um melhor conhecimento da biologia desta espécie, relacionados principalmente à conservação da sua biodiversidade.

1.2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CATETOS

Alguns aspectos reprodutivos fisiológicos dos catetos machos tem sido extrapolados a partir dos suínos domésticos (*Sus scrofa*), devido a similaridades gerais com esta espécie (MAYOR et al., 2006). Anatomicamente, os catetos possuem a bolsa escrotal localizada entre a região inguinal e perineal, a qual apresenta alguns pêlos finos e curtos. Seus testículos encontram-se envoltos por uma fáscia espermática fibrosa, extremamente resistente, e possuem forma ovalada, com duas margens e duas extremidades, sendo achatados latero-lateralmente. A margem “livre” dos testículos volta-se lateralmente, enquanto a epididimária mantém relações com o epidídimo medialmente (SONNER et al., 2004).

Os testículos apresentam média de 2,8 cm de largura, 2,6 cm de espessura, 5,4 cm de comprimento e $22,5 \text{ cm}^3$ de volume e ótima simetria (Figura. 2). Os machos atingem a maturidade sexual aos 11 meses e as fêmeas entre 8 e 14 meses, sendo a fêmea a iniciante do cortejamento para a cópula (BELLANTONI, 1991). De acordo com Costa et al., (2009) o cateto apresenta peso testicular médio de $23,7 \pm 1,8 \text{ g}$ e as células de Leydig ocupam $12,8 \pm 1,8\%$ do parênquima testicular. Seu ciclo espermatogênico e o processo inteiro da espermatogênese (com base em 4,5 ciclos) apresentam duração de cerca de $12,3 \pm 0,2$ e $55,1 \pm 0,7$ dias, respectivamente, sendo sua produção diária de espermatozóides por grama de testículo aproximadamente $23,4 \pm 2 \times 10^6$, semelhante à de suínos domésticos e selvagens (COSTA et al., 2009).

Em catetos, já foram realizadas com sucesso, coletas de sêmen por eletroejaculação usando-se diferentes protocolos anestésicos como, por exemplo, a associação da tiletamina-zolazepam (COSTA; PAULA, 2005) e o uso do anestésico propofol (SOUZA et al., 2009). De acordo com Souza et al. (2009), o ejaculado desta

espécie obtido por eletroejaculação apresenta volume médio de 2,8 mL, concentração de $67,7 \times 10^6$ espermatozoides/mL, motilidade de 75,4%, com 81,1% de viabilidade espermática, 81% de células morfologicamente normais e 77% de acrossoma íntegros. Hellgren et al.(1989), identificou três frações existentes no ejaculado de catetos. A primeira fração é límpida, a segunda considerada rica em espermatozoides e a terceira e última é a fração gel. Na análise morfométrica, o espermatozoide nesta espécie apresentou cabeça com 6 µm de comprimento, 4 µm de largura, peça intermediária e cauda medindo, respectivamente, $11,17 \pm 1,7$ µm e $26,56 \pm 1,99$ µm de comprimento, (SOUZA, 2009).

Dentre os estudos mais recentes relacionados à reprodução dos catetos estão os de Castelo, et al. (2010). Estes autores foram os primeiros a criopreservar o sêmen desta espécie, tendo avaliado o efeito da centrifugação nas amostras, antes da criopreservação, e o uso de diferentes açúcares (frutose e glicose) em adição ao diluente Tris. Os resultados mostraram que ambos os açúcares foram eficientes, demonstrando o sucesso na criopreservação do sêmen desta espécie. Quanto ao uso da centrifugação, esta é desaconselhável, pois afeta a morfologia espermática, bem como o movimento espermático após a descongelação. Ainda, Castelo, et al. (2010), usaram o diluente Tris-frutose contendo 20% de gema de ovo e 3% de glicerol e após 7 dias, as amostras foram descongeladas a 37°C por 1min, e a 55° por 7s. Os resultados obtidos de motilidade foram, respectivamente, $33,8 \pm 3,7\%$ e $28,2 \pm 3,5\%$. Dessa forma, diante dos resultados obtidos, surge a possibilidade de testar outros diluentes, bem como diferentes concentrações de glicerol e gema de ovo, no intuito de aperfeiçoar os protocolos e melhorar a eficiência da criopreservação de sêmen nesta espécie.



Figura 2. Aspecto do testículo de catetos (*Tayassu tajacu*). Fonte: Arquivo pessoal.

1.2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

1.2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

1.2.3.1 DILUENTES

De acordo com Neves et al., (1983), a elevada concentração espermática determina uma intensa atividade metabólica com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal após a coleta seminal, que se torna extremamente prejudicial à célula espermática. Logo, diminuindo-se a concentração após a ejaculação, aumenta-se a proporção diluente/espermatozóide, conferindo assim, uma maior proteção celular. Desse modo, elevadas diluições levam a uma congelabilidade adequada. Porém, deve-se considerar o número mínimo de espermatozóides móveis que deverá conter a dose inseminante, para que se possa ter um maior proveito do ejaculado (AZEVEDO et al., 2000). É importante ressaltar que o sêmen apropriadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em uma inseminação artificial (CONCANNON; BATTISTA, 1989).

A diluição do sêmen é essencial para o sucesso da técnica de criopreservação, pois os componentes dos diluentes auxiliam na preservação da integridade da membrana plasmática, que pode sofrer alterações devido à mudanças de temperatura (ENGLAND, 1993). Além disso, permite o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozóides *in vitro* (DERIVAUX, 1980). Sua composição difere segundo a espécie animal de procedência e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS; EVANS, 1991).

As principais características a serem consideradas de um diluente são: a extensão do volume, a fim de aumentar a quantidade de doses inseminantes e consequentemente o número de animais inseminados; efeito tamponante, visto que os espermatozóides possuem fraca resistência contra alterações de pH; manutenção da pressão osmótica; substrato energético, sendo os açúcares fonte de energia para os espermatozóides; atividade antimicrobiana, que consiste na adição de antibióticos, objetivando reduzir a

transmissão de bactérias que possam modificar as propriedades ou contaminar o sêmen e que, acima de tudo, sejam de fácil preparo e baixo custo (WATSON, 1979).

1.2.3.1.1 Tris

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) é uma substância facilmente solúvel em água, e disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Possui a capacidade de permanecer estável em temperatura ambiente por diversos meses e não inibir os processos enzimáticos (BATES, 1962). Tem capacidade tamponante, atuando em pH entre 7,0 e 9,0 (McPHAIL; GOODMAN, 1984).

Usualmente, para o preparo do diluente Tris, realiza-se a adição de uma hexose, a frutose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), como uma fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (ENGLAND, 1993). Rigau et al. (2001) demonstrou que a frutose parece ser sensível à atividade da enzima hexoquinase, apresentando assim um efeito significativo sobre o metabolismo da célula espermática, quando comparada à glicose.

Outra substância que participa da composição do Tris, é o ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) que atua como antioxidante, bem como no mecanismo de respiração celular, e contribui para a preservação da célula espermática auxiliando na manutenção do pH do diluente (SILVA, 2005), serve ainda como doador de prótons, produzindo o citrato que atua como anti-oxidante, bem como no mecanismo de respiração celular. Sua forma utilizada é a monohidratada (SILVA et al., 2002).

O Tris não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação da sua energia (RODRIGUES, 1997). A célula espermática dos mamíferos é capaz de obter a energia necessária para a manutenção de sua motilidade através da via glicolítica ou do ciclo de Krebs (RIGAU et al., 2002).

1.2.3.1.2 Água de coco em pó

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (NUNES; COMBARMOUS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando assim, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME; MARQUES Jr., 1994). A água de coco contém ainda outros compostos que mostram atividades semelhantes às daquelas das citocininas e que são derivados das purinas (difeniluréia), possuindo atividades biológicas consideradas excelentes para as células (NUNES; SALGUEIRO, 1999).

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal, obtendo-se bons resultados com sua utilização na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (CAMPOS et al., 2003), ovinos (FIGUEIREDO et al., 2001), suínos (TONIOLLI; MESQUITA, 1990), peixes (CARVALHO, et al., 2002) e cães (CARDOSO et al. 2006). Para determinar a fração da água de coco que atua sobre os espermatozóides, Nunes et al. (1999) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético (IAA), que ativa o metabolismo dos espermatozóides. A presença do IAA pode variar com o estágio de maturação e a espécie do fruto e influenciar nos resultados *in vitro* e *in vivo* em sêmen diluído em água de coco (NUNES; SALGUEIRO, 1999). A introdução do IAA na composição dos diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozóides um aumento de motilidade, maior taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais prolongados (NUNES et al., 1999).

Diluentes de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, há limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, e após sua extração, a água de coco apresenta dificuldades quanto à conservação por longos períodos, além de variações na constituição bioquímica da mesma entre os diferentes frutos (VIEIRA, 2007)

A água de coco sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto. Fatores como grau de maturação, variedade, região e época do ano de produção têm influência sobre as suas características físico-químicas, sendo necessária uma correção da osmolaridade e pH para o uso da água de coco *in natura*. Para isto, após filtrar a água de coco, adiciona-se água destilada e uma solução de citrato de sódio a 5%, resultando num diluidor eficiente, com uma relação custo/benefício favorável aos

programas de inseminação artificial no Brasil, sem custos adicionais com diluentes importados (NUNES; COMBARNOUS, 1995). Desta forma, isso motivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP[®] se caracteriza por possuir composição padronizada, obtida a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura* (NUNES, et al. 2005).

A ACP[®] foi testada inicialmente como diluente de sêmen de caprino (SALGUEIRO et al., 2002) e, mais recentemente, na criopreservação de sêmen de diversas espécies de peixes (VIVEIROS et al., 2008; VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008). Nunes et al., (2005) elaborou um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP[®]), sendo este um produto genuinamente nordestino. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (NUNES et al., 2005). O pó resultante final, registrado como ACP[®] (ACP Biotecnologia[®], Fortaleza - Ceará, Brasil), é ajustado quanto ao pH e osmolaridade a cada espécie a ser utilizado, recebendo uma denominação numérica de acordo com a espécie e sua utilização.

O ACP[®] foi testado com diferentes aplicações para o sêmen de diversas espécies, como: em eqüinos para a refrigeração (SAMPAIO-NETO et al., 2002), diluição para inseminação artificial em caprinos (SALGUEIRO et al., 2002), e ovinos (BRAZ et al., 2003), em peixes (VIEIRA et al., 2007), também em cães, para congelação com variações nos protocolos (CARDOSO, 2005; BARBOSA, 2007; MADEIRA, 2007), e em espermatozóides epididimários de cutias (*Dasyprocta agouti*) (SILVA, et al. 2011).

1.2.3.2 CRIOPROTETORES

O processo de criopreservação promove danos na capacidade funcional dos espermatozóides causados pelo choque térmico, o que leva a uma diminuição da fertilidade (JOHNSON et al., 2000). Dessa forma, buscando-se reduzir as crioinjúrias, várias substâncias denominadas de crioprotetores têm sido testadas (FULLER, 2004).

Os agentes crioprotetores podem ser classificados em não penetrantes, que aumentam a osmolaridade do meio extracelular, e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo assim, a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação, como exemplo,

as proteínas, os açúcares e o polivinil pirrolidona (ENGLAND, 1993); e em agentes crioprotetores penetrantes, os quais são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a criopreservação causa sobre a célula, por exemplo, o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etileno-glicol e o metanol. As características físico-químicas ideais que eles devem possuir são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (GONZALEZ, 2004). A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações podem minimizar e controlar os efeitos deletérios na célula durante os processos de congelamento e descongelamento (ROSSI et al., 2003).

Os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen são macromoléculas, como a caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol (EVANS; MAXWELL, 1990). Conforme Gil et al., (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo e leite na diluição pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto.

Outro aspecto relevante diz respeito ao estresse osmótico provocado pela adição das soluções crioprotetoras que provocam a desidratação celular ocasionando altas concentrações intracelulares de sais (BALL; VO, 2001), e promovendo alterações estruturais e funcionais na célula espermática (BUHR et al., 1994). Tais alterações atuam negativamente sobre a motilidade espermática e sobre trocas metabólicas através das membranas celulares, que podem ter um efeito negativo nos processos de capacitação espermática e no mecanismo de fertilização (NARDID et al., 1997), levando até mesmo à morte celular (WATSON, 1996). Os níveis de toxicidade promovidos pelos crioprotetores são dependentes de sua concentração e da duração da exposição das células aos mesmos, o que denota a importância da identificação da concentração ideal, equilibrando a toxicidade e a ótima crioproteção (FULLER, 2004). Na maioria dos trabalhos, a combinação de crioprotetores e diluentes são diferentes, sendo muito difícil saber qual é o fator ideal para cada espécie, já que eles atuam de forma distinta (MAISSE et al., 1998).

1.2.3.2.1 Glicerol

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) é um álcool polihídrico altamente permeável, e o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies (SILVA et al., 2003). Esse efeito crioprotetor deve-se a sua capacidade de reduzir as concentrações de eletrólitos presentes na fração não-congelada de sêmen; diminuir o ponto de congelação devido às propriedades das partículas presentes na sua constituição, as quais ligam-se facilmente a membrana celular, através de difusão passiva, sem alterar a osmolaridade interna e externa do espermatozoide (GONZALEZ, 2004).

É um álcool que contém três grupos funcionais hidroxila, que podem ligar-se ao hidrogênio da molécula de água em seis diferentes sítios de ligação. Além disso, os radicais hidroxila do glicerol podem algumas vezes ligar-se entre si, reduzindo a probabilidade de ligação com as moléculas de água, o que é indesejável, pois caso isso ocorra, haverá alta viscosidade da solução, que será responsável pela penetração mais lenta do crioprotetor na membrana plasmática, induzindo assim estresse osmótico (GILMORE et al., 1995; KAROW, 2001). Becker-Silva (2004) constatou que esse efeito é estabelecido cinco minutos após sua adição, fazendo com que haja uma diminuição na temperatura de transição dos lipídeos da membrana, consequentemente diminuindo a adesão entre as células (KUNDU et al., 2000). O glicerol, no entanto, possui efeitos tóxicos que podem alterar as propriedades físico-químicas do espermatozoide e levar ao rompimento de sua membrana plasmática, bem como causar alterações no acrossoma (CURRY, 2000; HOLT, 2000), causando uma desnaturação protéica, além da alteração nas interações da actina e indução de bolhas na membrana (ALVARENGA et al., 2005). Hammerstedt e Graham (1992) revisaram outros efeitos celulares causados pelo glicerol, que incluíram alterações nos eventos citoplasmáticos pelo aumento da viscosidade intracelular, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtúbulos, efeitos no balanço bioenergético e alteração direta na membrana plasmática e glicocálice. Porém, devido aos seus componentes, essa ação do glicerol depende da concentração usada em cada diluente, e em cada espécie, devido às particularidades no processo de resfriamento, congelação e descongelação, além das particularidades seminais (WATSON, 2000).

A toxicidade do glicerol é parcialmente induzida pelo estresse osmótico, pois o glicerol penetra a membrana plasmática mais lentamente que outros crioprotetores

(GILMORE et al., 1995). Ainda, foi proposto que o glicerol, assim como outros crioprotetores penetrantes, são osmoticamente ativos, alterando o conteúdo de água e causando estresse ao entrar ou sair da célula (BHUR et al., 2001; KHEIROLOMOOM et al., 2005; SZTEIN et al., 2001).

Para o sêmen suíno, o glicerol em concentrações mais elevadas pode ser tóxico para fertilidade (PARKS; GRAHAM, 1992). Estudos realizados por Graham (1996) comparando a viabilidade pós-descongelação de espermatozóides suínos congelados com 0, 1, 2 ou 5% de glicerol, mostraram que a motilidade e integridade acrossomal de espermatozóides diminuíram ao se usar 5% de glicerol. Em catetos, existe apenas uma referência a criopreservação de sêmen a qual sugere o uso de 3% de glicerol (CASTELO et al., 2010). Desse modo, faz-se necessário estudar a ação de outras concentrações deste crioprotetor sobre o sêmen desta espécie.

1.2.3.2.1.2 Gema de ovo

A gema de ovo de galinha protege a membrana plasmática do espermatozóide devido a sua capacidade de restaurar os fosfolípidos perdidos durante o choque térmico ocorrido durante o resfriamento do sêmen (HAMMERSTED et al., 1990). Nesse momento ocorre uma interação entre as lipoproteínas da gema de ovo, chamadas fosfatidilcolinas, e os lípidos da membrana plasmática (FARSTAD, 1996). Outro fator responsável pela crioproteção é a prevenção da liberação da enzima hialuronidase, evitando-se a difusão do diluente e dificultando assim, a ocorrência de danos à membrana e dos componentes protéicos presentes na gema de ovo (SANTOS, 2004).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema protegem os espermatozóides contra o choque térmico (MIES FILHO et al., 1982). A fração ativa da gema de ovo responsável por esta proteção é uma lipoproteína de baixa densidade (LDL- Low-Density Lipoprotein) (WATSON; MARTIN, 1975). Tem sido sugerido que a LDL pode-se agregar à membrana plasmática durante o processo de criopreservação, evitando a perda de fosfolípidos da membrana e aumentando a tolerância ao processo de criopreservação (FOOTE, 2003). Entretanto o papel dos componentes lipídicos e protéicos da LDL ainda não foi elucidado.

A gema de ovo é usualmente utilizada na concentração de 20%, mas estudos laboratoriais revelaram que esta concentração dificulta as avaliações metabólicas (WALL, et al.,1999). Sendo assim vários trabalhos foram realizados a fim de desenvolver técnicas com diferentes concentrações de gema de ovo (inferiores a 20%) e soluções. Em trabalho realizado por Barros, 2010, resfriando sêmen suíno, foi observado que a gema de ovo não teve ação sobre a membrana da célula espermática. O mesmo ocorreu quando Fernandez et al.,(2006) testaram as concentrações de 0,5 e 20% de gema de ovo na conservação dos espermatozoides provenientes do epidídimo de veados, onde não obtiveram diferença estatística entre as diferentes concentrações. Apesar da gema de ovo não interferir nos resultados de vitalidade e morfologia, sua análise é dificultada quanto maior for a sua concentração. Este dado também foi observado por Barbosa et al. (2007) ao comparar as concentrações de 5, 10 e 20% de gema de ovo adicionada ao diluente água de coco em pó (ACP-106) na criopreservação do sêmen canino, onde as concentrações de 3, 5 e 7% de gema de ovo adicionadas ao diluente alternativo ACP-103 podem ser utilizadas como diluente eficiente para o sêmen suíno. Em catetos, Castelo et al. (2010) demonstraram ser possível a criopreservação de sêmen utilizando a gema de ovo em concentrações de 20% no diluente Tris. Entretanto, necessita-se conhecer se uma concentração inferior a 20% manteria o mesmo padrão de integridade espermática.

1.2.3.3 CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN

O sêmen congelado pode ser mantido em bancos de sêmen por prazo indeterminado, o que possibilita o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados (GODINHO, 2007). A criopreservação do sêmen das espécies domésticas é um processo complexo que envolve a interação entre muitos fatores tendo em vista a obtenção de resultados satisfatórios. Para garantir o sucesso no processo de congelação é necessário ter o conhecimento não somente do diluente a ser utilizado, das taxas de diluição, resfriamento ou descongelação, mas também o conhecimento da própria fisiologia espermática da espécie, que é essencial para uma maior recuperação espermática após a descongelação, e, conseqüentemente, para a obtenção de altas taxas de fertilidade (PURDY, 2006).

Existem diferentes metodologias para a criopreservação de sêmen. As razões pelas quais um meio diluidor confere maior ou menor proteção aos espermatozóides deve-se ao fato de haver diferenças na composição da membrana espermática entre espécies, raças ou entre indivíduos da mesma espécie (HOLT, 2000). Segundo Hunter (1982), a viabilidade de espermatozóides congelados está relacionada a fatores como, o diluente e a concentração de células; o agente crioprotetor adequado e sua concentração no meio, o tempo e a temperatura de equilíbrio, a natureza da curva de resfriamento, a natureza da curva de descongelação, a utilização de um meio de descongelação específico e o modo de eliminar o agente crioprotetor (diluição ou diálise).

Segundo Hopkins e Evans (1991), a sensibilidade dos espermatozóides às mudanças de temperatura se deve a ação protetora do plasma seminal e à integridade da membrana espermática. Esta última relaciona-se tanto com sua composição lipídeo-protéica como de colesterol e fosfolipídios. Alguns diluentes mantêm a viabilidade do sêmen a temperatura ambiente, enquanto que outros são refrigerados entre 4 e 5 °C para ajudar a controlar o crescimento bacteriano e reduzir a taxa metabólica das células espermáticas.

A criopreservação do sêmen apresenta dificuldades como à formação de cristais de gelo intra- e extracelulares e aumento da concentração de solutos (MATEOS-REX; AGUILLAR, 1996). Foram observadas diferenças com relação à congelabilidade e fertilidade do sêmen entre indivíduos e entre ejaculados de um mesmo indivíduo (WATSON, 1981). Logo, a comparação entre os métodos e protocolos de congelação-descongelação do sêmen torna-se difícil, devido aos diferentes parâmetros envolvidos e a falta de uniformidade nas metodologias (LEBOEUF et al., 2000).

A criopreservação mantém a vida fértil do sêmen por um período indefinido à temperatura de -196°C em nitrogênio líquido, entretanto grande proporção de espermatozóides não consegue sobreviver ao processo de congelação e descongelação (NOAKES et al., 2001). A velocidade de congelação é responsável pela cristalização e vitrificação da água intraespermática. Se há uma congelação mais lenta, a cristalização da água livre extra-espermática dá origem a uma exsmose e desidrata a célula espermática. A congelação rápida evita esta desidratação dos espermatozóides e, conseqüentemente, promove menos danos à célula (AZEVEDO et al., 2000). Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores.

A técnica de criopreservação celular pode ser dividida em três etapas: 1) As células são submetidas a uma solução crioprotetora (metanol, etilenoglicol, glicerol e outros) que penetra na célula e substitui a maior quantidade de água intracelular; 2) Posteriormente, a célula deve ter sua osmolaridade regulada, ficando isotônica com o meio extracelular, o que pode causar efeitos tóxicos e impacto osmótico nas mesmas; 3) Finalmente, diminui-se a temperatura passando pelo ponto de congelamento da água e da solução crioprotetora onde, segundo a curva de criopreservação empregada, se realizará de maneira diferente a formação de cristais, os quais podem danificar a célula (LEZCANO, 2001). Existem vários utensílios e equipamentos para congelar as amostras de sêmen, sendo os mais utilizados as geladeiras de isopor, *dry shippers*, freezers reguláveis e botijões criogênicos, dentro dos quais são introduzidas palhetas francesas plásticas, cujo volume pode ser de 0.25, 0.5 e 5 mL (MAISSE et al., 1998).

As injúrias causadas pela criopreservação são prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino (SALAMON; MAXWELL, 1995). Segundo Bailey et al. (2000), a capacitação espermática induzida pela congelação poderia produzir uma população de espermatozóides após a descongelação com viabilidade curta e ineficiente. Após o processo de preservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade a fim de alcançar o local da fecundação e manter a integridade das membranas espermáticas para efetuar a penetração do ovócito (ROYERE, 1996), já que qualquer falha inerente à fisiologia espermática poderia prejudicar sua capacidade de fertilização do oócito como também de suportar o desenvolvimento embrionário (HOLT; LOOK, 2004).

Durante a congelação-descongelação, os espermatozóides são submetidos a condições desfavoráveis como desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, efeito solução e a formação de gelo intracelular (PARKS ; GRAHAM, 1992). A consequência imediata destes processos é a ruptura da membrana plasmática (WATSON, 2000) devido aos estresses térmico, mecânico, químico e osmótico exercidos sobre a célula durante a criopreservação (PARKS; GRAHAM, 1992). O acrossoma também pode sofrer mudanças estruturais e degenerativas, como ruptura da membrana acrossomal (HAFEZ, 1995). Tais danos provocam perda da integridade da membrana, causando morte celular e modificações na habilidade de responder ao estresse ou manter o volume isotônico (PETRUNKINA et al., 2004). Segundo THUNDATTHIL et al. (1999), o processo de criopreservação está associado com danos à função dos espermatozóides, incluindo inchaço e ruptura da célula, perda

da permeabilidade seletiva da membrana e mudança na sua fluidez, além de redução da motilidade e da viabilidade espermáticas (GRAVANCE et al., 1997).

A criopreservação possui como ponto crítico, o resfriamento inicial, que vai do momento em que a amostra é colhida, até atingir 4°C, procedida pela formação dos cristais de gelo (YU et al., 2002). A congelação se torna bem sucedida, quando se consegue um equilíbrio entre as taxas de resfriamento e congelação, juntamente com o uso de um crioprotetor ideal (BURGUESS et al., 2001). Existem dois métodos de resfriamento bastante utilizados para esse fim. Em um deles o resfriamento do sêmen é feito através do uso de um recipiente com gelo, evitando-se o contato direto do gelo com o recipiente onde o sêmen está contido (HAY et al., 1997). No outro, o sêmen pode ser colocado em geladeira convencional, acondicionado em recipiente fechado e mantido á temperatura de 37°C, evitando-se queda brusca de temperatura (LINDE-FORSBERG, 1991). A adoção de ambos contribuiu para o estabelecimento de curvas de congelação ideais adaptadas aos ruminantes (CHEMINEAU et al., 1991), carnívoros (SILVA et al., 2006) e suínos (SELLÉS et al., 2003).

A temperatura de descongelação utilizada depende diretamente da curva de criopreservação. Quando a criopreservação acontece utilizando-se uma curva moderada, o aquecimento deverá ser com temperatura moderada. Nesse caso, os cristais de gelo formados durante a criopreservação sofrem o degelo e diluem os solutos do meio extracelular lentamente e, em seguida, atravessam a membrana reidratando a célula. Caso os espermatozóides sejam aquecidos rapidamente, os cristais de gelo descongelam-se e a água penetra à célula rapidamente. Esse movimento e a alteração rápida no volume da célula danificam os espermatozóides (PARKS; GRAHAM, 1992).

Quando os espermatozóides são congelados rapidamente, o aquecimento deverá ser muito rápido. Nessa situação, os cristais de gelo descongelam e diluem os solutos do meio extracelular e os microcristais de gelo intracelular degelam. Após a descongelação acontece pouco movimento de água por meio da membrana, porque não houve tempo suficiente para ocorrer a desidratação dos espermatozóides durante a criopreservação. Quando a temperatura de aquecimento é alta, os microcristais de gelo intracelular descongelam e a temperatura não permite que ocorra sua reorganização em cristais maiores, fenômeno conhecido como recristalização. A recristalização acontece preferencialmente quando o sêmen é congelado rapidamente e aquecido lentamente (PARKS; GRAHAM, 1992). A curva de criopreservação ideal deve ser suficientemente lenta, para permitir que os espermatozóides se desidratem e, rápida o bastante, para

evitar que os espermatozóides fiquem expostos, por muito tempo, às altas concentrações de soluto. Segundo Squires et al. (1999), as altas concentrações de soluto promovem a desidratação celular, levam à deformação celular, causam danos estruturais na membrana, desalojam proteínas de membrana, desnaturam proteínas e separam as estruturas do citoesqueleto. Todas essas alterações podem ser deletérias aos espermatozóides.

1.2.4 AVALIAÇÃO DE SÊMEN

Para ter a certeza da viabilidade do sêmen colhido, este deve ser avaliado quanto a seus parâmetros macroscópicos, como aspecto e volume, e microscópicos, como motilidade, vigor, concentração, viabilidade, integridade da membrana plasmática e acrossômica. Os parâmetros macroscópicos são os primeiros a serem avaliados. O volume deve ser avaliado com auxílio de tubos graduados, ou através de pipetagens, para uma maior precisão. Em catetos, Souza et al. (2009) conseguiu uma média de 2,8mL de sêmen, porém, Castelo et al. (2010), obteve um volume um pouco superior, 3,7mL, podendo os mesmos servirem de padrão para futuros trabalhos a serem realizados com o sêmen desta espécie. A cor do sêmen pode variar de esbranquiçado ao amarelado, bem como marrom ou vermelho, dependendo de vários fatores como espécie, concentração, alimentação e estado clínico. Sêmen de cor clara, esbranquiçado a amarelado, indica se a amostra contém ou não espermatozóides, devendo-se sempre efetuar a avaliação microscópica. Sêmen amarelado pode indicar contaminação por urina ou indica a presença de certas substâncias na alimentação do animal. Colorações escuras, variando de vermelho a marrom indicam a presença de sangue fresco ou digerido, respectivamente (KUSTRITZ, 2007).

1.2.4.1 Motilidade e vigor

Segundo Derivaux (1980), a avaliação da motilidade espermática é definida como o percentual de espermatozóides móveis em uma amostra e sua intensidade de movimento. A motilidade e o vigor são parâmetros que devem ser avaliados imediatamente após a coleta. A motilidade expressa a porcentagem (0-100%) de células

móveis no ejaculado enquanto que o vigor representa a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides móveis (0-5) (ZAMBELLI; CUNTO, 2006). A motilidade pode ser analisada através do microscópio óptico, fotomicrografia com lapso de tempo, videomicrografia quadro a quadro, espectrofotometria e análise computadorizada (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Esse parâmetro não serve para avaliar a viabilidade espermática, pois espermatozóides imóveis não estão necessariamente mortos. Por outro lado, espermatozóides com boa motilidade após a descongelação podem ser incapazes de fertilizar um oócito caso apresentem danos acrossomais (STROM et al., 1997).

1.4.2.2 Concentração espermática

A concentração espermática avalia o número de espermatozóides por mililitro de sêmen ejaculado, e pode ser calculada com a utilização de câmara hematimétrica, realizando-se uma diluição conhecida do sêmen e colocando-se o mesmo na câmara de Neubauer para proceder à contagem (CBRA, 1998), ou através do uso de espectrofotômetros ou colorímetros calibrados a um hemocitômetro, sendo estes mais precisos e rápidos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

1.4.2.3 Teste hiposmótico

A membrana plasmática dos espermatozóides é uma estrutura que contém lipídios, proteínas e carboidratos que envolvem todo o espermatozóide, regulando a entrada de moléculas (VARNER, 2008). As membranas biológicas são responsáveis pela homeostase celular, por meio das trocas realizadas com o meio externo. Formam uma barreira semipermeável para moléculas e servem para manter e modular a composição do meio intracelular. Além disso, protegem a célula contra as influências do ambiente extracelular, tanto no trato genital masculino até os espermatozóides serem ejaculados, quanto no trato genital feminino até ocorrer à fertilização. Além disso, as membranas biológicas também protegem a célula de influências não fisiológicas, quando os espermatozóides são colocados nos diluentes seminais (EINARSSON, 1992).

Os espermatozóides funcionais mantêm um equilíbrio osmótico com o ambiente em que se encontram. Quando são expostos às soluções hiposmóticas, aqueles com membrana funcional sofrem aumento de tamanho, no intuito de estabilizar o equilíbrio

osmótico, produzindo um inchaço típico na região da cauda e, conseqüentemente, alterações na morfologia espermática. Os espermatozóides por apresentarem morfologia singular, ao sofrerem o choque osmótico tendem a promover um dobramento de cauda, dando, portanto, um indicativo que estavam com membrana íntegra antes do teste (DELL'AQUA JÚNIOR et al., 2002). Segundo Garner (1997), a fertilização não poderá ocorrer caso as membranas estejam bioquimicamente inativas, mesmo que estejam estruturalmente intactas.

O aumento no volume sofrido pelo espermatozóide exposto a condições hiposmóticas ocorre com um mínimo de aumento na sua área superficial. Assim, após a expansão da membrana plasmática na sua cauda, os filamentos axiais flexíveis iniciam um processo de encurvamento ou enrolamento, conferindo uma aparência mais esférica à célula espermática. Segundo Souza (2003), acredita-se que a membrana plasmática da região da cabeça do espermatozóide tenha o mesmo comportamento que a da cauda, porém não é possível essa observação pelo teste hiposmótico.

Segundo DELL'AQUA JÚNIOR et al. (2002), o teste hiposmótico seria mais uma ferramenta, de fácil execução e baixo custo, que proporciona melhores subsídios na avaliação da viabilidade espermática. Além disso, o teste avalia os espermatozóides individualmente, e não uma população destas células como ocorre na avaliação da motilidade progressiva (NEILD et al., 1999).

1.2.4.4 Viabilidade espermática

A viabilidade espermática também está relacionada à integridade da membrana plasmática (CHEMINEAU et al., 1991). Esta pode ser avaliada por meio de colorações vitais, onde os espermatozóides que possuem integridade de membrana, não são corados (“viáveis”) e os que possuem danos na membrana permitem a entrada do corante no citoplasma (“inviáveis”) (BEARDEN; FUQUAY, 1992). Dentre os corantes utilizados podemos citar a eosina-nigrosina (BEARDEN; FUQUAY, 1992), azul de tripan, Giemsa (BEARDEN; FUQUAY, 1992) e azul de bromofenol (MEDEIROS, 2004) (Figura 3).

A integridade da membrana espermática é um atributo essencial para a fertilidade de espermatozóide e, por isso, a análise deste parâmetro é fundamental para a predição da fertilidade (LUZ et al., 2000).

De modo semelhante, a integridade do acrossoma é pré-requisito básico para garantir um bom potencial de fertilidade dos espermatozóides, uma vez que o percentual de espermatozóides que apresentaram reação acrossomal possui correlação negativa com a fertilidade (GIL et al., 2003).

Entretanto, a integridade acrossomal não reflete necessariamente a integridade de membrana, sendo importante o uso de testes que combinem ambas as avaliações (HOLT, 2000). É possível a ocorrência de lesões do acrossoma durante congelamento e descongelamento, sem que isto interfira na motilidade espermática (TASSERON et al., 1977).



Figura 3. Espermatozóide de cateto corado com azul de bromofenol (. Fonte: Arquivo pessoal.

1.2.4.5 Uso de sondas fluorescentes

A integridade de membrana plasmática não é importante apenas para o metabolismo espermático, mas também para o sucesso da fertilização do oócito (SILVA, 2005). Segundo Harkema e Boyle (1992) os resultados da marcação de fluorescência utilizando o CFDA e o IP têm sido correlacionados com os resultados de motilidade das amostras avaliadas. A coloração com o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP) parece oferecer algumas vantagens sobre a avaliação visual ao microscópio óptico, pois os resultados obtidos na coloração são

menos sujeitos a erros subjetivos e menos dependentes da temperatura e tempo que o exame realizado pós-descongelamento (SNOECK, 2003).

A marcação com sondas fluorescentes tem como objetivo avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática da célula espermática (SOUZA, 2003). O CFDA é uma solução não fluorescente que penetra o ambiente celular e é, rapidamente, convertida em carboxifluoresceína pelas esterases intracelulares. A carboxifluoresceína age, por ser uma substância fluorescente não permeável que é mantida no meio intracelular na presença de uma membrana plasmática intacta, apresentando a coloração verde. Por outro lado, o PI tem a capacidade de marcar o DNA de células que estão mortas ou têm sua membrana danificada, emitindo fluorescência vermelha quando excitada (PEÑA et al., 1998). Essas sondas fluorescentes também podem ser utilizadas para avaliação em citômetro de fluxo (SILVA, 2005)

De acordo com a coloração apresentada pelos espermatozoides, consideram-se três categorias para a interpretação dos achados:

- Íntegros - espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Células coradas pelo CFDA, apresentando-se verde em toda a sua extensão (Figura 4).
- Lesados - espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesadas. Células coradas pelo IP, apresentando-se vermelha (Figura 4).
- Semi-lesados - espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra. Células coradas pelo CFDA na região do acrossoma e núcleo corado pelo IP, apresentando acrossoma verde e núcleo vermelho (SNOECK, 2003).

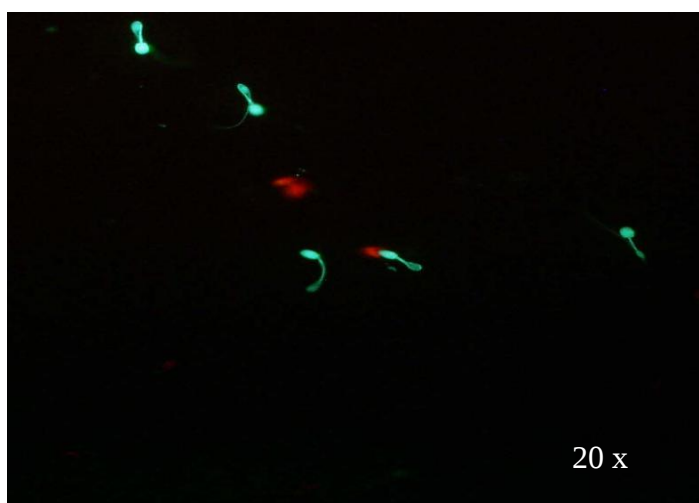


Figura 4. : Espermatozoides de cateto corados com iodeto de propídio (vermelhos) e carboxifluoresceína (verdes).

1.2.4.6 Avaliação da morfologia espermática

Com relação à morfologia espermática sua avaliação pode ser realizada pela coloração do esfregaço de sêmen e/ou pela preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou de interferência onde são contadas, no mínimo, 200 células e calculada a porcentagem de defeitos encontrados (CBRA, 1998). Derivaux (1980) relata que as anormalidades espermáticas podem afetar, isolada ou simultaneamente, as diferentes regiões da cabeça, peça intermediária e peça principal. As alterações de cabeça são relacionadas quanto à forma, dimensão, duplicação e acrossomas, as de peça intermediária quanto a sua amplitude, dimensão, duplicação, fratura e inserção e, as flagelares quanto a tamanho, calibre, enrolamentos (Figura 5), dobraduras e duplicações, além da presença de gotas citoplasmáticas nos espermatozóides (VIEIRA, 2007).

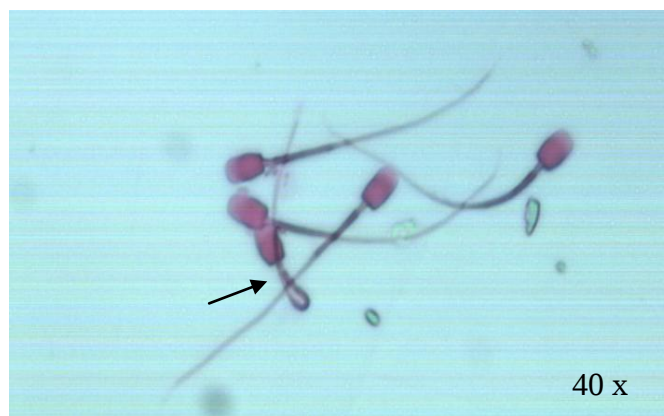


Figura 5. Espermatozóide de cateto corado com rosa bengala apresentando defeito morfológico de cauda enrolada (seta). Fote: Sousa, 2010.

Para se avaliar a morfologia espermática, pode-se fazer uso de diversos corantes: Eosina-Nigrosina (DOTT; FOSTER, 1972), Spermac (OETTLÉ, 1993), Rosa de Bengala (RODRIGUES, 1997), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-Eosina (SILVA et al., 2003) e Azul de Bromofenol (MEDEIROS, 2004). Oliveira, et al (2009)

comprovou que o corante azul de bromofenol promoveu uma melhor avaliação dos espermatozóides, principalmente no que diz respeito as alterações de cabeça, pois corou menos o fundo da lâmina, diminuindo os artefatos, podendo assim, ser indicado na avaliação da integridade acrossômica. Além disso, Medeiros (2004), demonstrou a eficiência do corante após o armazenamento a temperatura ambiente (30°C) por trinta dias, o que facilita sua utilização em exames andrológicos a campo. Searger (1986) sugere a classificação das alterações morfológicas espermáticas como primárias, relacionadas a problemas na espermatogênese, e secundárias, quando os problemas estão relacionados a maturação no epidídimo ou devido à errônea manipulação, seja esta durante o processamento, resfriamento, congelação ou descongelação.

Existe correlação entre a morfologia espermática e a fertilidade, principalmente quando ocorrem defeitos acrossomais (FOOTE, 2003), Esta correlação depende da qualidade do sêmen examinado e da metodologia empregada na avaliação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). As anormalidades espermáticas podem reduzir a fertilidade por não permitir a chegada do espermatozóide ao local da fecundação, bem como, incapacitar a fecundação ou o desenvolvimento embrionário inicial (CHEMINEAU, 2005).

1.2.5 JUSTIFICATIVA

O crescente interesse pela exploração biotecnológica dos catetos (*Tayassu tajacu*), devido seu valor econômico e ameaça de extinção, tem aumentado a busca em aprimorar os trabalhos já existentes relacionados à sua reprodução. Recentemente, Castelo et al., 2010, mostrou ser possível a criopreservação do sêmen desta espécie com o diluente Tris, acrescido de gema de ovo e glicerol, obtendo-se uma motilidade espermática de até 30% após a descongelação. A curva de congelação empregada por Sellés et al., 2003 em suínos, que consiste em aproximadamente 5 horas.

Diante disso, busca-se aprimorar essa técnica, testando-se diluentes alternativos, que forneçam um melhor subsídio nutritivo para a célula espermática. A Água de Coco em Pó (ACP) vem sendo usada na criopreservação do sêmen de diversas espécies, obtendo-se ótimos resultados após a descongelação das amostras, por ser um produto de origem vegetal, de fácil obtenção e possuir rico substrato nutritivo. Da mesma forma, torna-se prático testar outras formas de criopreservação, afim de minimizar o tempo gasto durante o processo de criopreservação. Sendo assim, a presente dissertação busca a realização desse aprimoramento, disponibilizando um bioprocessos que favoreça e disponibilize uma relação custo/benefício favorável na implantação de bancos de germoplasma de espécies nativas em vias de extinção.

1.2.6 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- I. O diluente à base de água de coco em pó (ACP®) poderia ser utilizado como uma alternativa para a criopreservação do sêmen de catetos.
- II. Menores concentrações de gema de ovo e glicerol seriam mais eficientes para a criopreservação do sêmen de catetos.
- III. Curvas de congelamento mais rápidas poderiam ser mais adequadas para a criopreservação do sêmen de catetos.
- IV. Volumes de palheta de 0,25mL ou 0,5mL, bem como temperaturas de descongelamento de 37°C/60s ou 70°C/8s, exerceriam alguma influência sobre os parâmetros qualitativos do sêmen pós-descongelamento.

1.2.7 OBJETIVOS

1.2.7.1 Geral

Estabelecer um protocolo eficiente para a criopreservação do sêmen de catetos utilizando diluente à base de água de coco em pó (ACP®).

1.2.7.2 Específicos

Determinar a porcentagem de gema de ovo (10 ou 20%) a ser adicionada ao diluente ACP para a criopreservação do sêmen de catetos;

Comparar o efeito de diferentes concentrações de glicerol (1,5 ou 3%) no diluente ACP® sobre as características espermáticas de catetos no sêmen após procedimentos de congelamento/descongelamento;

Aperfeiçoar os protocolos de criopreservação do sêmen destes animais, através da determinação da curva ideal de congelamento do sêmen;

Comparar as palhetas plásticas de diferentes volumes (0,25 ou 0,5ml) utilizadas para o envase do sêmen de catetos;

Avaliar qual a melhor temperatura (37°C/1min ou 70°C/8s) a ser utilizada na descongelamento do sêmen.

1.2.8 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, N.I.; OHASHI, O.M.; GUIMARÃES, D.A.; PENDU, Y.L.; DIAS, H. **Alternativas de sistemas de produção de catitu (*Tayassu tajacu*) para pequena agricultura na Amazônia**. Manaus: Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em [HTTP://ftp.mct.gov.br/prog/ppg7/pdf/livro107.pdf](http://ftp.mct.gov.br/prog/ppg7/pdf/livro107.pdf) Acesso em: 14 Set. 2011.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. **Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review**. Anim. Reprod. Sci., v. 89, p. 105-113, 2005.

AZEVEDO, H.C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T. **Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática**. Rev. Cient. Rur., v. 2, p. 148- 157, 2000.

BAILEY, J. L; BILODEAU, J. F; CORMIER, N.. **Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon**. J. Androl., 21: 1-7, 2000.

BALL, B.A.; VO, A. **Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential**. J. Androl.,v. 22, p. 1061-9, 2001.

BAMBERG, E.; MOSTL, E.; PATZL, M. et al. **Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species**. J. Zoa Wlldl. Med., v.22, p.73-77, 1991.

BARBOSA, C. C. **Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do glicerol e da adição de antibiótico**. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

BARROS, T. B. **Qualidade espermática do sêmen suíno conservados a baixas temperaturas em diluentes alternativos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

BATES, R.G. **Determination of pH: Theory and Practice**, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 161p, 1962.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. New Jersey: Prentice-Hall, 478p. 1992.

BECKER-SILVA S. C. **Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de**

crioprotetores permeantes. 121f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BELLANTONI, E. Habitat use by mule deer and collared peccaries in an urban environment. Tucson: **University of Arizona press.** v. 43, p. 2-33, 1991. BHUR, M.; FISER, P.; BAILEY, J.; CURTIS, E. **Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes.** J. Androl., v. 22, p. 961–969, 2001.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. **Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, n. 18, p 97-104, 1994.

BRAZ, V. B.; ARAÚJO, A. A.; NUNES, J. F.; MACHADO, V. P.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, K. P. L. **Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. v.27, n.3, p.328-329, 2003.

BROWN, J.L.; WASSER, S.K.; WILDT, D E. et al. **Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces.** Biol. Reprod., v.51, p.776-786, 1994.

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

BURGUESS, C. M; BREDL, J.C; PLUMMER, J.M; ENGLAND, G. C. **Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation.** J Reprod Fertil Suppl, 57: 357–363, 2001.

BYERS, J. A.; BEKOFF, M. **Social, spacing and cooperative behavior of the collared peccary, *Tayassu tajacu*.** Journal of Mammalogy, v. 62, n. 4, p. 767-785, 1981.

CAMPOS, A.C.N., NUNES, J.F., MONTEIRO, A.W.U. , PINHEIRO, J.H.T., FERREIRA, M.A.L., ARAUJO, A.A., CRUZ, J.F., **Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil.** Rev. Bras. Reprod. Anim. 27, 620-624, 2003.

CARDOSO, J. F. S. **Uso do diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®) para o resfriamento a 4 °C do sêmen canino.** Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Ceará –UECE. Departamento de Ciências Animais para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, 2006.

CARDOSO, R.C.S. **Características in vitro do espermatozóide canino criopreservado em água de coco.** Tese apresentada a Universidade Estadual do Ceará-UECE. Departamento de Ciências Animais para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias, 2005.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R, UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. **Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations.** Theriogenology, 59, 743 – 751, 2003.

CARVALHO, T. C.; CAMÂRA, J. B. D. **Geo Brasil 2002: perspectivas do meio ambiente no Brasil.** Brasília: Edições IBAMA, 440p. 2002.

CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; SOUZA, A.L.P.; MOREIRA, M.A.P.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. **Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders.** Theriogenology 74 1060-1065, 2010.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. 1991. CHENOWETH, P.J. **Genetic sperm defects.** Theriogenology, v.64, p.457-468, 2005.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p, 1998.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy.** Philadelphia: WB Saunders, p. 1247-1259, 1989.

COSTA, D.S., PAULA, T.A.R. **Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*)** Biota Neotropica 5, 1-6, 2005.

COSTA, G. M. J.; LEAL, M. L.; SILVA, J. V.; FERREIRA, A. C. S.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. **Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*).** Journal of Andrology. 2009.

COSTA, L.P.; LEITE, Y.L.R.; MENDES, S.L.; DITCHFIELD, A.D. **Conservação de Mamíferos no Brasil.** Megadiversidade, v.1, n.1, 2005.

CRUZ, M.P.; WARKEN; L.J.; SOUZA,D.C.; TEIXEIRA,V.L.B.; NASCIMENTO JUNIOR, A.F. **Estudo do cateto (*Tayassu tajacu*) e queixada (*Tayassu pecari*) no Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava- Paraná) : Regime semicativeiro - Universidade Paranaense-UNIPAR,** 2009.

CURRY, M. R. **Cryopreservation of semen from domestic livestock.** Rev. Reprod. v. 5, p. 46-52, 2000.

DE SOUZA- MAZUREK, R.R.; PEDRINHO, T.; FELICIANO, X.; HILARIO, W.; GERONCIO, S.; MARCELO, E. Subsistence **hunting among the Waimiri Atroari Indians in central Amazonia, Brazil.** Biodiversity and Conservation, v. 9, p. 579-596, 2000.

DELL'AQUA JÚNIOR, J.A., PAPA, F.O. **Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para a congelação de sêmen eqüino.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14., 2001, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio 103 Brasileiro de Reprodução Animal, p.460-462, 2001.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 446p, 1980.

DOTT, H.M., FOSTER, G.C. **A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a different “live/dead” stain**. J. Reprod. Fertil., v.29, p.443-445. 1992.

EINARSSON, S. **Concluding remarks**. Acta Veterinaria Scandinavica, v.88, p.165-166, 1992.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. **Mammals of the neotropics. The central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. V. 3. 1999.

ENGLAND, G.C.W. **Cryopreservation of dog semen: a review**. J. Reprod. Fertil., Suppl. 47, p. 243 -255, 1993.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Editora Acribia, Zaragoza, 192 p., 1990.

FARSTAD, W. **Semen cryopreservation in dogs and foxes**. Anim. Reprod. Sci., v.42, p.251-260, 1996.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. **Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated of red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa**. Reproduction in Domestic Animals, v.41, p.114-118, 2006.

FIGUEIREDO, E.L., MONTEIRO, A.W.U., SILVA FILHO, A.H.S., CAMPOS, A.C.N., NUNES, J.F.. **Avaliação in vitro do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservado em nitrogênio líquido**. Rev. Bras. Reprod. Anim. 25, 430-431, 2001.

FILHO, M. F. C. **Morfologia dos estômagos do queixada (*Tayassu pecari*) e do cateto (*Tayassu tajacu*) (Linnaeus, 1789)**. Dissertação apresentada a Universidade de São Paulo-USP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia para obtenção do título de Mestre em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, 2005.

FOOTE, R.H. **Fertility estimation: a review of past experience and future prospects**. Animal Reproduction Science, n.75, p.114-139, 2003.

FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. 5.ed. St. Louis: Saunders, p. 782, 2003.

FULLER, B. J. **Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state**. Cryo. Lett., v. 25, p. 375-388, 2004.

GARNER, D.L. **Ancillary tests of bull semen quality.** Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v.13, n.2, p.313-330, 1997.

GIL, J., LUNDEHEIM, N., SODERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.** Theriogenology, v.59, p.1241-1255, 2003.

GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SODERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination.** Theriogenology. 59, 1157-1170, 2003.

GILMORE, J. A.; McGRANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. **Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa.** Biol. Reprod., v. 53, p. 985-995, 1995.

GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of stallion spermatozoa.** Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice v.12, p.131-147, 1996.

GODINHO, H. P. **Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção.** Rev Bras Reprod Anim 2007;31(3):351-360.

GONZALEZ R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozóide bovino. 2004. Tese (Doutorado) – USP, Pirassununga, 2004.

GRAVANCE, C.G.; WHITE, C.; ROBERTSON, K.R.; CHAMPION, Z.J.; CASEY, P.J.. **The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads.** Anim. Reprod. Sci., v.49, p.37–43, 1997.

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal.** 7.ed., Barueri-SP: Manole, 513p, 2004.

HAFEZ, E.S.S.E. **Reprodução Animal.** São Paulo: Ed. Manole Ltda., 6 ed. 1995.

HAMMERSTEDT, R. S.; GRAHAM, J. K. **Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol.** Cryobiology, v. 29, p. 26-38, 1992.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. **Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive.** J. Androl. v.11, p.73-88, 1990.

HARKEMA, W.; BOYLE, M.S. **Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa.** In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992. Proceedings... Den Haag, p.1424-1426, 1992.

HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J. et al. **Canine spermatozoacryopreservation and evaluation of gamete interaction.** Theriogenology, v.48, p.1329-1342, 1997.

HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v. 127, p.527-535, 2004.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOLT, W.V.; PICARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod.*, v. 4, p 143-150, 1999.

HOPKINS, S.M., EVANS, L.E. In: McDONALD, L.E. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4 ed. Interamericana: México, 1991.

HUNTER, R.H.F. *Fisiologia e Tecnologia da Reproducao da Femea dos animais domesticos*. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO). **Seis espécies de mamíferos dotados de casco correm risco de extinção no Brasil**. Disponível em <<http://www.icmbio.org.br>> Acesso em: 28 de setembro de 2011.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* v. 62, p. 143–172, 2000.

JUDAS, J.; HENRY, O. Seasonal Variation of home range of collared peccaries in tropical rain forests of French Guiana. *Journal of Wildlife Management*, v. 63, p. 546-552, 1999.

KAROW, A. M. For mammalian embryologists. Georgia, USA: Augusta, Cryobiology, p. 1-37, 2001.

KHEIROLOMOOM, A.; SATPATHY, G.R.; TÖRÖK, Z.; BANERJEE, M. Phospholipid vesicles increase the survival of freeze-dried human red blood cells. *Cryobiology* v. 51, p. 290–305, 2005.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*. V. 40, p. 117–125, 2000.

KUSTRITZ, R. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, v.68, p. 329-337, 2007.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.

LEZCANO, M. Evaluación de cuatro agentes crioprotectores en la criopreservación de espermatoforos, masa y suspensión espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). Bogotá: Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2001. 115p. (Monografía, Curso en Biología Marina).

LINDE-FORSBERG, C. **Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen.** Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract., v.21, p.467-485, 1991.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. **Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 37, n. 2, p. 136-140, 2000.

MADEIRA, V. L. H. **Criopreservação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP - 106®): efeito do tempo de equilíbrio e da taxa de descongelação.** Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Ceará-UECE. Departamento de Ciências Animais. para obtenção do título de Mestre em Mestrado em Ciências Veterinárias, 2007.

MAISSE, G.; LABBE, C.; OGIER DE BAULNY, B.; LEVERONI, S.; HAFFRAY, P. **Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons.** INRA. Prod. Anim. v.11, n.1, p.57-65, 1998.

MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C.G.C. **Técnicas de control de la reproduccion en ganado caprino.** In: **Nuevas tecnicas de reproduccion asistida aplicadas a la produccion animal.** Cuenca: Universidad de Castilla la Mancha. p.183-202, 1996.

MAYOR, P.; FENECH, M.; BODMER, R.E.; LOPEZ-BEJAR, M. **Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon General and Comparative.** Endocrinology .147 268-275, 2006.

McPHAIL, D.B., GOODMAN, B.A. **Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems.** Bioch. J. v.221, p.559-560, 1984.

MEDEIROS, A. A. **Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino.** Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Ceará-UECE. Departamento de Ciências Animais. para obtenção do título de Mestre em Mestrado em Ciências Veterinárias, 2004.

MENA, P.V.; STALLINGS, J.R.; REGALADO, J.B.; CUEVA, R.L. 2000. **The sustainability of current hunting practices by the Huaorani.** Pp. 57-78. In: **Hunting for sustainability in tropical forests** (J. G. Robinson e E.L. Bennett, eds.). Columbia University Press, New York.

MIES FILHO, A., DUTRA, J., GIRÃO, R.N. **Congelamento do sêmen ovino na primavera.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 5, p. 27-57, 1982.

NARDID, O.; DYUBKO, T.; REPINA, S. **A comparative study of the effect of freezethawing on peripheral and integral membrane proteins.** Cryobiology, v.34, p.107-113, 1997.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, A. **Hypotonic test in equine spermatozoa.** Theriogenology, v.51, p.721–727, 1999.

NEVES J. P.; BLAYA M. C. R.; TEIXEIRA P. R. **Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos.** A Hora Vet. V. 14, p. 11-14, 1983.

NOAKES D. E.; PARKISON T. J.; ENGLAND G. C. W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetris.** 8ª. ed. London: Saunders, 2001, 868 p.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; CUNHA-NOGUEIRA, S.S.; TAKECHI, S.A. **Estrutura social de pecaris (Mammalia, Tayassuidade) em cativeiro.** Revista de Etologia, n. 1, p. 89-98, 1999.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; NOGUEIRA, S.S.C. **Criação comercial de animais silvestres: Produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil.** Revista Econômica do Nordeste 31188-195, 2000.

NOWAK, D.M.; PARADISO, J.L. **Walker's mammals of the world.** 2 ed. The John Hopkins University Press, EUA. p.1184-1185, 1983.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. **Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos.** Rev. Cient. Prod. Animal, v. 1, p.17-26, 1999.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. **Utilização da água de coco e suas funções ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1, 1995, Anais... Fortaleza: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da UECE, p. 57-63, 1995.

OETTLÉ, E. E. **Sperm morphology and fertility in the dog.** J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, p.257-260, 1993.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A. M.; ARAÚJO, A. A. **Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol.** Ciência Animal Brasileira, v. 10, n. 3, p. 862- 869. 2009.

PARKS, J.E; GRAHAM, J.K. **Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.** Theriogenology, v. 38, p. 209–22, 1992.

PEÑA AI, BARRIO F, QUINTELA LA, HERRADÓN PG,. **Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity.** Theriogenology 50, 163-174, 1998.

PETRUNKINA, A.M.; GROPPER, B.; GUNZEL-APEL, A.R.; TOPFER-PETERSEN,E. **Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen.** Reproduction, v.128, p.829–842, 2004.

PURDY, P. H. **A review on goat sperm cryopreservation.** Small Rumin. Res., v. 63, p. 215–225, 2006.

RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRIGUEZ-GIL, J.E. **Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates.** Theriogenology, v.56, p.815-829, 2001.

RIGAU, T., RIVERA, M., PALOMO, M.J., FERNANDEZ-NOVELL, J.M., MOGAS, T., BALLESTER, J., PEÑA, A., OTAEGUI, P.J., GUINOVART, J.J., RODRIGUEZ-GIL, J.E. **Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa.** Reproduction, v.123, p.579-591, 2002.

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado.** Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.. Departamento de Ciências Animais. para obtenção do título de Mestre em Mestrado em Ciências Veterinárias, 1997.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. *Anais...* Palestras.

ROSSI, T. C.; PAPA, F. O.; SANTOS, T. B. et al. **Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S. **Cryopreservation of spermatozoa: a review.** Human Reproduction Update, v. 2, p. 553-559, 1996.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. **Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination.** Anim. Reprod. Sci. 37, 185-249, 1995.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K. L. P.; VIEIRA, V. E.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. **Utilização de diluentes à base de água de coco —in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl., n.5, p.96-98, 2002.

SAMPAIO- NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. **Utilization of ACP 105® extender in the refrigeration of stallion semen.** Brazilian Journal of Animal reproduction, v. 5, p137-139, 2002.

SANTOS, D. O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.S.C.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. A SANTOS, I.W. **Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelamento do sêmen canino.** Jaboticabal, 63p. 2004a.

SANTOS, M.H.B; OLIVEIRA, M. A.L; LIMA, P.F. **Diagnóstico de Gestação na Ovelha e na Cabra.** – São Paulo: Livraria Varela,157p, 2004b.

SANTOS, Tatiana Carlesso. **Morfologia dos ovários, tubas uterinas e útero em catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu pecari*, Link, 1795).** vol.37. n.3. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., p.00-00, ISSN 1413-959, 2000.

SANTOS, D. O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.S.C.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. A criação de catitus (*Tyassu tajacu*) como alternativa de diversificação de produção e renda na região cacauzeira da Bahia, Brasil. 2009. **Manejo da Fauna Silvestre em Amazonia e Latino-America**. Disponível em: <http://www.revistafauna.com.pe/memo/247-256.pdf> . Acesso em: 13 maio 2009.

SEAGER, S. W. J. Artificial insemination in dogs. In: Burke, T. J. (Ed). **Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment**, Philadelphia: Lea & Febiger, p. 207-217, 1986.

SELLÉS, E., GADEA, J., ROMAR, R., MATÁS, C., RUIZ, S. **Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility**. Reproduction in Domestic Animals, v.38, p.66-72, 2003.

SICURO, F. L.; OLIVEIRA, L. F. B. **Coexistence of peccaries and feral hogs in the brazilian pantanal wetland: an ecomorphological view**. Journal of Mammalogy, v. 83, n. 1, p. 207–217, 2002.

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. **Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.35, n.2, 2006.

SILVA, A.R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. Tese apresentada a Universidade Estadual do Ceará-UECE. Departamento de Ciências Animais. para obtenção do título de Doutor em Mestrado em Ciências Veterinárias, 2005.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. *et al.* **Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process**. Theriogenology, v.59, p.821-829, 2003.

SILVA, A.R; CARDOSO, R.C.S; UCHOA, D.C; SILVA, L.D.M. **Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing**. The Veterinary Journal. v.164, p.244-6, 2002.

SIMPSON, G.G. **Tempo and Mode in Evolution** – Columbia: Columbia University Press, 1984.

SNOECK, P. P. N. Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. Tese apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Ciências Animais. para obtenção do título de Doutor Ciências Veterinárias, 2003.

SONNER, J. B.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T. C.; CARVALHAL, R.; ASSIS NETO, A. C.; MOURA, C. E. B.; OLIVEIRA, M. F. **Aspectos macroscópicos e**

morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. Biota Neotropica, v. 4, n. 2. 2004.

SOUZA, A.L.P.; CASTELO, T.S.; QUEIROZ, J.P.A.F.; BARROS, I.O.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. **Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation.** Animal Reproduction Science. v. 116, n. 3, p. 370 – 375, 2009.

SOUZA, P. C.; RAMOS, R. S. L.; GUIMARAES, D. A. A.; FERREIRA, A. C. S.; BASTOS, L. V.; BATISTA, C. R.; OHASHI, O. M. **Determinação da população folicular em cutias (*Dasyprocta* sp.) criadas em cativeiro.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 27, n. 2, p. 286-287, 2003.

SOWLS, L.K. **Javelines and other peccaries: Their biology, management and use.** 2 ed. Tucson, Arizona: University of Arizona Press, 1997.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K. et al. **Cooled and frozen stallion semen.** Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin, n.9, 80 p., 1999.

STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. **In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation.** Theriogenology. v.48, p.247-256, 1997.

SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. **Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation,** Cryobiology, v. 41, p. 28–39, 2001.

TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. **Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing.** Journal of Reproduction and Fertility, v. 51, p. 461-462, 1977.

THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SODERQUIST, L.; MAPLETOFT, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen–thawed bull semen and fertility with artificial insemination,** Int. J. Androl. v.22, p.366–373, 1999.

TONIOLLI, R.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y.; BUSSIÈRE, J. **Fração ativa da água de coco: conservação e fertilidade do sêmen de suíno.** Revista Brasileira Reprodução Animal, v. 21, n. 3, p. 29-40, 1997.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D. S. M.; CAVALCANTE, S. G. **Avaliação in vitro do sêmen de suíno diluído em BTS e na água de coco in natura e estabilizada.** Revista Brasileira Reprodução Animal, 22, n. 4, p. 198-201, 1998.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, S.M. **Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 14, p. 249-254, 1990.

VARNER, D. D. **Developments in stallion semen evaluation**. Theriogenology, v.70, p.448–462, 2008.

VEIGA, J.B.; TOURRAND, J.F.; QUANZ, D. **Agropecuária na Transamazônica. O caso do Município de Uruará**. Documento de Pesquisa. Belém, PA: EMBRAPA. p. 54. 1995.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. **Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaratus brachypomus* (Pisces, Characidae)**. Fortaleza. Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Ceará-UECE. Departamento de Ciências Animais. para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, 2008.

VENTURIERI, B., LE PENDU, Y. **Padrões de Atividades de *Caititus (Tayassu tajacu)* em Cativeiro**. Revista de Etologia. v. .8, n. 1, p. 35-43, 2006.

VIEIRA, M. J. A .F.; CARVALHO, M. A. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ROMÃO, J. M.; VASCONCELOS, R. O.; SILVA NETO, R. O. A. R.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. **Fertilização de óvulos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), com uso de solução à base de água de coco em pó (ACP-104)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Belo Horizonte, MG: CBRA, p.67, 2007.

VIVEIROS, ATM, MARIA, AN, ÓRFÃO, LH, CARVALHO, MAM,NUNES, JF. **Powder coconutwater (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species**. Cybium–Int. J. Ichthyol. 32 (Suppl.8th ISRPf), 215, 2008.

WALL, R. J, FOOTE, R. H. **Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk-tris glycerol extender**. Journal Dairry Science. v.82, p.817-821, 1999.

WATSON, P.F. **Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1996, Germany. Proceedings... Germany, p.135-140, 1996.

WATSON, P.F. **Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function**. Reprod. Fertil. Dev., v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen**. Anim. Reprod. Sci. v.60-61, p.481-492, 2000.

WATSON, P.F. **The preservation of semen in mammals**. Oxford Rev. Reprod. Biol. v.1, p.183-350, 1979.

WATSON, P.F. **The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5oC by egg yolk lipoprotein**. Journal of Reproduction and Fertility, v.62, p.483-492, 1981.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C. **The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C**. Australian Journal of Biology Science, v. 28, p. 145-152, 1975.

YU, I.; LEIBO, S. P. **Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C.** Theriogenology. v. 57, p. 1179-1190, 2002.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. **Semen collection in cats: Techniques and analysis. Review.** Theriogenology, v. 66, p. 159–165, 2006.

2. CAPÍTULO 2. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*) USANDO DILUENTE A BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-116C®) ACRESCIDO DE GEMA DE OVO E GLICEROL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c®) based extender plus different egg yolk and glycerol concentrations

M.A. Silva, G. C. X. Peixoto, G. L. Lima, J. A. B. Bezerra, L. B. Campos, A.L.C.

Paiva, V.V. Paula, A.R.Silva

Submetido a revista *Theriogenology* em 19/10/2011

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*) USANDO DILUENTE A BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-116C ®) ACRESCIDO DE GEMA DE OVO E GLICEROL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

2.1 RESUMO

O presente estudo tem por objetivo avaliar a eficiência de um diluente a base de Água de Coco em Pó (ACP-116C ®), com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol, como uma alternativa para a criopreservação de sêmen catetos. Um total de doze ejaculados foram obtidos a partir de machos adultos, criados em cativeiro, através de eletroejaculação, e foram avaliados para a motilidade espermática, vigor, viabilidade, morfologia e integridade da membrana acrossômica e funcional. Os ejaculados foram fracionados em alíquotas que foram diluídas em Tris acrescido de 10% gema de ovo e 3% de glicerol ou em ACP-116C ® adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo (10 ou 20%) e glicerol (1,5 e 3%). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, descongeladas após um mês a 37 °C por um min, e avaliadas como relatado para o sêmen fresco, e também para a integridade da membrana dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. Observou-se que o processo de congelamento e descongelamento induziu a diminuição da qualidade espermática, tendo-se o sêmen fresco como referência. Em relação à comparação entre os grupos, verificou-se que ACP-116C ® acrescido de 20% gema de ovo e 3% de glicerol, proporcionou melhores resultados de motilidade e vigor após a descongelamento do que quando comparado com diluente Tris ($p < 0,05$). No entanto, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos em relação às outras características espermáticas ($p > 0,05$). Em conclusão, o diluente à base de água de coco, ACP-116C ®, acrescido de 20% gema de ovo e 3% glicerol pode ser utilizado eficientemente para a criopreservação de espermatozóides de catetos adultos.

Palavras-chave: *Tayassu tajacu*; sêmen; criopreservação; água de coco.

2.2 INTRODUÇÃO

Durante vários anos, o cateto (*Tayassu tajacu*) tem estado sob constante ameaça de caça predatória nos países da América Latina (BODMER et al., 1997). Como resultado, esses animais foram recentemente classificados como vulneráveis à extinção no Brasil, e são considerados como criticamente ameaçados nos biomas Caatinga e Mata Atlântica (ICMBio, 2011). Tendo em vista sua atual situação, se faz necessária a elaboração de protocolos para a armazenagem de sêmen de cateto, para permitir a formação de bancos de germoplasma e, assim, seu uso em programas de reprodução em cativeiro. No entanto, dados na literatura sobre a criopreservação de espermatozóides nesta espécie ainda são escassos, e só o diluente Tris-base têm sido usados para este fim até agora (CASTELO et al., 2010, a,b).

O uso de diluentes à base de água de coco tem sido propostos na busca de diluentes de sêmen alternativos que não sejam tóxicos, tenham baixo custo, capacidade tamponante, seja prático e eficaz (CARDOSO et al., 2005). A água de coco é uma solução composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, indutores de divisão celular e eletrólitos diversos, que fornecem os nutrientes necessários para a preservação de células (BLUME; MARQUES, 1994). O diluente Água de Coco em Pó (ACP ®, ACP Biothecnology, Fortaleza, Brasil), surge como uma alternativa para ser usado em técnicas aplicadas a biotecnologia do sêmen, o que permite seu uso mesmo em regiões onde o fruto *Cocos nucifera* não ocorre naturalmente (CARDOSO et al., 2007). O ACP ® foi demonstrado ser um diluente eficiente para a conservação de espermatozóides obtidos de várias espécies, como cães (CARDOSO et al., 2007), peixes (VIVEIROS et al., 2007), varrões (TONIOLLI et al., 2010), e cutias (SILVA et al., 2011), no entanto, não há relatos do seu uso em catetos.

O glicerol é o crioprotetor mais comumente empregado em diferentes espécies para a criopreservação do sêmen, incluindo o cateto (CASTELO et al., 2010, a,b). A concentração de glicerol ideal no diluente, representa um equilíbrio entre os seus efeitos tóxicos e protetores, pois altas concentrações podem afetar a capacidade de fertilização dos espermatozóides (ENGLAND, 1993). Além disso, a gema de ovo de galinha foi adicionada aos diluentes de sêmen para proteger a membrana espermática, restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico que ocorre durante o resfriamento inicial de sêmen (HAMMERSTEDT et al., 1990). Devido sua capacidade de

tamponamento, a quantidade de gema de ovo varia de acordo com a capacidade tampão dos outros componentes do diluente (FARSTAD, 1996).

O presente estudo tem por objetivo avaliar a eficiência de um diluente a base de Água de Coco em Pó (ACP-116C ®) com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol, como uma alternativa para a criopreservação de sêmen catetos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O comitê de ética da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA aprovou os protocolos experimentais, bem como os procedimentos de assistência adotado aos animais (Processo n ° 23091.0253/114). Os reagentes utilizados no presente estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.3.1 Animais

Um total de nove catetos machos sexualmente maduros, com $40,7 \pm 1,6$ meses de idade e $22,5 \pm 2,8$ kg foram utilizados no estudo. Os animais pertenciam ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres- CEMAS da UFERSA, localizado no Nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil, $5^{\circ} 100''$ S, $37^{\circ} 100''$ W). A região é sujeita a um clima semi-árido típico, com uma temperatura média anual de 27° C. Os animais foram isolados fisicamente das fêmeas por um período de seis meses antes do início do estudo e foram mantidos sob fotoperíodo natural de 12 h. Posteriormente, foram divididos em grupos de quatro e cinco animais e mantidos em piquetes ao ar livre (20 m x 3 m), com uma área coberta (3 m x 3 m). Os animais foram alimentados com uma dieta a base de sementes e frutas, e a água foi fornecida *ad libitum*.

2.3.2 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum por 12h antes de iniciar os experimentos. Então foram contidos fisicamente com o auxílio de um puçá, em seguida um cateter venoso foi introduzido na veia cefálica para a fluidoterapia (0,9% soro fisiológico), e anestesiados com a administração intravenosa de propofol (Propovan ®, Cristalia, Fortaleza, Brasil), dado em *bolus* (5 mg / kg) (SOUZA et al., 2009). Quando o animal apresentou sinais de despertar, foram administradas doses adicionais de propofol (cerca de 1,25 mg / kg), dada para prolongar a anestesia. Durante todo procedimento, seus parâmetros fisiológicos foram monitorados.

2.3.3 Coleta de sêmen

Os animais foram mantidos em decúbito lateral, e o sêmen foi obtido utilizando um electroejaculator (Autojac ®, Neovet, Campinas, SP, Brasil) conectado a uma fonte de 12 V. O ciclo de estimulação incluiu 10 estímulos em cada tensão, a partir de 5 V, e seguido por um aumento de tensão, de 1 V até 12 V. Cada estímulo elétrico durou 3s, com intervalos intermitentes de 2s. O ciclo de estímulos foi mantido por um período de 10 min a partir do início do procedimento. A sonda do electroejaculator media 15 cm de comprimento e 1,3 cm de diâmetro; um comprimento de 12 cm foi inserido no reto (CASTELO et al., 2010, a,b). O sêmen foi colhido em tubos de plástico e imediatamente avaliado.

2.3.4. Avaliação de sêmen

Só foram utilizadas as amostras de sêmen com motilidade superior a 80% e vigor igual ou acima de 4 (CBRA, 1998). O volume de sêmen foi medido por micropipetas, e a cor do sêmen foi avaliada. Motilidade (%), vigor (0 -5) foram avaliados imediatamente pela avaliação de uma amostra (5µL) sob microscopia de luz a 100 e 400x de ampliação. Lâminas utilizando o corante Azul de Bromofenol (DERIVAUX, 1980) foram preparadas com 5 µL de sêmen para avaliar a viabilidade e morfologia espermática e integridade acrossômica em microscopia de luz (1000×), com contagem de 200 células por lâmina. Os defeitos morfológicos detectados foram classificados como primários ou secundários. Após a avaliação inicial, uma alíquota de 5 µL de sêmen foi diluída em formol tamponado a 10% (1 mL) e a concentração espermática foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer para contagem. A integridade funcional da membrana espermática foi avaliada através do teste hiposmótico (HOST), usando água destilada (0 mOsm / L) como a solução hiposmótica (MOUSSA et al., 2002). Uma alíquota (0,01 mL) de sêmen foi diluído em 0,09 mL de solução hiposmótica e mantida em banho-maria a 38 ° C. Após 45 min, uma alíquota da solução foi colocada sobre uma lâmina de vidro, coberto por uma lamínula, e avaliada com auxílio de microscopia de contraste de fase (400x), contando 200 células. Os espermatozóides com caudas enroladas e inchaço foram considerados com membrana funcional.

2.3.5 Diluentes e procedimentos de congelação e descongelação

O diluente Tris-base foi utilizado como grupo controle. Este diluente efoi composto de 3,028 g Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado, 1,25 g D-frutose dissolvidas em 100 mL de água ultrapura (CASTELO et al., 2010a), com osmolaridade de 295 mOsm/L e pH 6,6. Além disso, 10% gema de ovo foi adicionada a este diluente.

O ACP ® utilizado no experimento foi registrado como ACP-116C ® para uso na criopreservação do sêmen catetos. ACP-116C ® é composto de água de coco desidratado e reguladores de pH. Um pacote de ACP-116C ® contém 12 g do produto, que deve ser diluído com 50 mL de água destilada de acordo com a recomendação do fabricante (ACP® Biotecnologia, Fortaleza, Brasil). Após a reconstituição, o pH do diluente foi de 7,4 com uma osmolaridade de 307 mOsm / kg. Este diluente foi testado com a adição de 10% (grupo ACP10) e 20% (grupo ACP20) de gema de ovo. As amostras de sêmen foram divididas em três alíquotas imediatamente após a coleta e avaliação inicial. Após diluição em Tris, ACP10 ou ACP20, todas as amostras foram armazenadas em tubos plásticos, e colocadas no interior de copos plásticos contendo água (30 mL) a 27 ° C e equilibrada para 240 min para chegar a 5 ° C no resfriamento. Subsequente ao resfriamento, a amostra controle foi adicionada em Tris, acrescido de 6% de glicerol (também a 5 ° C), o que resultou em uma concentração final de 3% de glicerol no diluente. As amostras foram divididas em outras duas alíquotas e para tanto foram adicionadas de 3 e 6% de glicerol, o que resultou em uma concentração final de 1,5 e 3% de glicerol. Após a segunda diluição, obtivemos quatro grupos: ACP10-1.5, ACP10-3, ACP20-1.5, e ACP20-3. Para todas as amostras, a diluição final resultou em uma concentração espermática de 100×10^6 espermatozóides / mL. A motilidade e vigor foram avaliados imediatamente após a adição de glicerol. As amostras foram acondicionadas em palhetas de 0,25 mL e colocadas horizontalmente em uma caixa térmica por 20 min, a 3 cm acima do nível de nitrogênio líquido (N₂). Finalmente, as palhetas foram mergulhadas em N₂ líquido para armazenamento (-196°C). Depois de um mês, as amostras foram descongeladas por imersão as palhetas em banho-maria a 37°C por min. O sêmen teve todos os seus parâmetros imediatamente avaliados, como foi relatado para o sêmen fresco. Além disso, a integridade da membrana plasmática foi avaliada por sondas fluorescentes, como será descrito adiante.

2.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides após a descongelação

A integridade da membrana plasmática foi avaliada com uma solução de fluorescência que continha os fluoróforos 6-diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). Inicialmente, amostras frescas de ejaculado foram utilizadas para padronizar os protocolos de avaliação de sêmen de catetos. Uma alíquota de 10µL de sêmen descongelado foi adicionada em 40µL de solução fluorescente. Após 10 minutos, alíquotas das amostras marcadas foram avaliadas por microscopia de epifluorescência (Leica - episcopic Fluorescent Attachment "EFA" Set lâmpada halógena, Suécia). Para cada amostra corada com CFDA/PI, foram contados 200 espermatozóides e classificados como tendo ou não um plasmalema intacto com base emissão de fluorescência. As membranas celulares corados em verde (CFDA) foram consideradas intactas, enquanto que aquelas marcadas em vermelho (PI) ou parcialmente coradas foram consideradas como não-intactas (SILVA et al., 2006).

2.3.7 Análise estatística

Um total de 12 repetições foram realizadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade pelo teste de Levene, utilizando o Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, EUA). Os valores expressos em percentuais foram transformados em arco seno. Comparações entre diferentes diluentes sobre os parâmetros seminais foram feitas por análise de variância seguida do teste-t de Student. O efeito dos diluentes no vigor espermático foi avaliado pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Sêmen fresco e diluído

Foram realizadas um total de vinte tentativas para a coleta do sêmen, e estas foram realizadas em nove animais, dos quais o sucesso na ejaculação só foi alcançado em apenas sete animais, obtendo-se dezessete ejaculados (dezessete de vinte - 90% de sucesso na coleta de um ejaculado). Foram utilizados apenas doze ejaculados, os outros cinco não foram utilizados no experimento, devido ao baixo volume, motilidade, ou vigor. Em relação aos ejaculados incluídos no experimento, foram coletados dois ejaculados de cada um dos três animais, três outros ejaculados foram obtidos de apenas um macho, cada, e três amostras foram coletadas de um mesmo macho. Os doze ejaculados utilizados possuíam cor branca e aspecto aguado. As outras características do espermáticas estão presentes na Tabela 1. Foi observado que em qualquer grupo, a adição dos diluentes não provocou declínio na motilidade ou vigor ($p > 0,05$). O contrário foi observado após a adição do glicerol, onde houve uma redução significativa ($p < 0,05$) da motilidade e vigor em todas as amostras (Tabela 2).

2.4.2 Características espermáticas após a descongelação

O processo de congelamento e descongelamento induziu uma diminuição nas características espermáticas de todos os tratamentos (Tabela 3). Em relação à comparação entre os grupos, verificou-se que ACP-116C ® adicionado de 20% gema de ovo e 3% de glicerol, proporcionou melhores resultados de motilidade e vigor após a descongelamento que as amostras do diluente Tris ($p < 0,05$). No entanto, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos em relação às outras características espermáticas ($p > 0,05$).

Tabela 1.

Características físico-químicas do ejaculado fresco de catetos (*Tayassu tajacu*) coletados por eletroejaculação. (N = 12 ejaculados).

	Média $\pm$ DP	Variação
Volume (mL)	2,8 $\pm$ 0,7	0,6 – 7,5
Concentração espermática ($\times 10^6$)	765 $\pm$ 313,7	150 – 4130
Motilidade espermática (%)	86,7 $\pm$ 2,6	85 – 95
Vigor (0-5)	4,4 $\pm$ 0,3	3– 5
Viabilidade espermática (%)	92,3 $\pm$ 1,6	83 – 100
Teste hiposmótico (%)	75, 3 $\pm$ 2,3	65,0 – 86
Morfologia espermática		
Normal (%)	83,2 $\pm$ 2,2	67 – 92
Defeitos primários (%)	0,7 $\pm$ 0,4	0 – 3
Defeitos secundários (%)	16,17 $\pm$ 2,4	8 – 33
Defeitos totais (%)	16,84 $\pm$ 2,2	8– 33

Tabela 2.

Valores de Média $\pm$ DP da motilidade espermática e vigor do sêmen fresco, diluído e glicerolizado do semen (n=12) de catetos (*Tayassu tajacu*) usando diluente à base de Tris (grupo controle) e água de coco em pó (ACP-116C[®]) adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo (GE) e glicerol (GL).

Semên	Diluente	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
Fresco		86,7 $\pm$ 2,6 ^a	4,4 $\pm$ 0,3 ^a
Diluído	Tris	75,4 $\pm$ 3,3 ^a	3,7 $\pm$ 0,2 ^a
	ACP adicionado 10% GE	77,5 $\pm$ 3 ^a	3,7 $\pm$ 0,1 ^a
	ACP adicionado 20% GE	79,2 $\pm$ 3,8 ^a	3,8 $\pm$ 0,2 ^a
Glicerolizado	Tris	49,6 $\pm$ 6,5 ^{b,c}	2,5 $\pm$ 2,3 ^b
	ACP adicionado 10% GE and 1,5% GL	61,7 $\pm$ 5,4 ^{bc}	2,9 $\pm$ 0,3 ^b
	ACP adicionado 10% GE and 3% GL	54,2 $\pm$ 6 ^b	3,1 $\pm$ 0,2 ^b
	ACP adicionado 20% GE and 1,5% GL	57,9 $\pm$ 6,6 ^b	3 $\pm$ 0,2 ^b
	ACP adicionado 20% GE and 3% GL	57,5 $\pm$ 6,3 ^b	3,1 $\pm$ 0,3 ^b

^{a, b, c} Na mesma coluna, subscritos diferentes correspondem a diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3.

Características físico-químicas pós-descongelamento do semen de catetos (N=12), diluído em Tris (grupo controle) ou em água de coco em pó (ACP-116C[®]) adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo (GE) e glicerol (GL).

	Tris	ACP adicionado 10% GE e 1,5%GL	ACP adicionado 10% GE E 3%GL	ACP adicionado 20% GE e 1,5%GL	ACP adicionado 20% GE e 3%GL
Motilidade espermática (%)	30,4 ± 5,7 ^b	33,4 ± 5,5 ^{ab}	40,8 ± 6,9 ^{ab}	44,6 ± 6,2 ^{ab}	48,3 ± 6,1 ^a
Vigor (0-5)	2,4 ± 0,2 ^b	3,0 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,2 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,2 ^a
Viabilidade espermática (%)	36,6 ± 5,6	42,7 ± 4,8	40,4 ± 5,3	41,7 ± 4	45,3 ± 4,8
Teste hiposmótico (%)	50 ± 5,8	50,3 ± 6,5	61,17 ± 5,62	57,5 ± 5,7	59,9 ± 5,0
Integridade da membrana(%)	34,1 ± 7,1	30 ± 6,8	33,3 ± 7,9	33,4 ± 6,5	25,8 ± 5,0
Morfologia espermática					
Normal (%)	64,6 ± 5,4	63,4 ± 6,0	65,84 ± 5,3	57,5 ± 5,7	64,75 ± 5,6
Defeitos primários(%)	3,1 ± 1,1	0,9 ± 0,5	6,75 ± 3,93	2,34 ± 0,8	3,25 ± 0,9
Defeitos secundários(%)	33,2 ± 5,6	35,7 ± 6,0	27,34 ± 5,8	36,9 ± 6,9	32,0 ± 5,8
Defeitos totais (%)	36,3 ± 5,3	36,6 ± 6,0	34,08 ± 5,3	30,6 ± 3,9	35,25 ± 5,6

^{a,b} Na mesma coluna, subscritos diferentes correspondem a diferença estatística significativa (p < 0,05).

2.5 DISCUSSÃO

A conservação *ex-situ* da genética de pequenas populações de espécies criadas em cativeiro por estarem ameaçadas de extinção, como o cateto, a fim de re-introduzi-los na natureza, está atraindo um crescente interesse (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998). Além disso, o desenvolvimento da biotecnologia de criopreservação de sêmen oferece uma oportunidade para maximizar o potencial reprodutivo da espécie, contribuindo tanto para sua preservação, como para o desenvolvimento de estratégias para a sua produção em programas de melhoramento em cativeiro. Este segundo lugar é especialmente interessante, pois os catetos são importantes também para a economia das populações da América Latina, devido ao comércio da carne e peles que são bem aceitos no mercado internacional (BODMER et al., 1997).

Na presente pesquisa, observou-se que todas as amostras sofreram uma redução dos parâmetros seminais após sua descongelação independentemente do diluente. Na verdade, sabe-se que os espermatozóides sofrem alterações sucessivas no volume das células, devido mudanças osmóticas causadas durante a adição do glicerol, e o processo de congelamento e descongelamento (MANN, 1975). Além disso, as propriedades de fluidez e funcionalidade das membranas espermáticas são modificadas, devido a diminuição da temperatura durante as fases de resfriamento e congelamento, bem como durante a descongelamento (HOLT, 2000). Isso resulta em uma redução da sua permeabilidade seletiva, o que leva a um grande influxo de cálcio (MAXWELL; JOHNSON, 1997). A membrana plasmática é o principal local onde ocorre lesão nos espermatozóides criopreservados, e os principais danos ocorrem durante a congelamento e descongelamento (BAILEY et al., 2003), resultando em uma perda substancial da viabilidade.

Os resultados obtidos com o diluente Tris-base, após a descongelamento foram semelhantes aos já relatados na literatura (CASTELO et al., 2010 a, b). No entanto, foi demonstrado que o ACP-116C® pode ser eficientemente usado como uma alternativa para a congelamento do sêmen de catetos. Além disso, o uso de ACP-116C ® acrescido de 20% gema de ovo e 3% de glicerol, promoveu uma preservação significativamente melhor do motilidade e vigor, quando comparado com o Tris. As características bioquímicas do ACP® são muito semelhantes aos da Água de Coco Fresca. Além de sua rica composição (BLUME; MARQUES, 1994), a Água de Coco também é composta de arginina, lisina, e altas concentrações de Na^+ e K^+ , que são fatores importantes para a reverter a supressão da motilidade e longevidade (ALMEIDA;

SOARES, 2002). Além disso, foi demonstrado anteriormente que o ácido 3-indol-acético (IAA), um hormônio vegetal presente na água de coco, pode aumentar a conservação de sêmen de suínos (TONIOLLI et al., 1996), que é a espécie doméstica mais intimamente relacionado com o cateto (CAVALCANTE-FILHO et al., 1998).

Deve-se mencionar que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos formados por ACP-116C®, entretanto, melhores resultados qualitativos para motilidade e vigor, foram obtidos quando 20% gema de ovo acrescido de 3% de glicerol foram utilizados, diferindo significativamente do diluente Tris-base. Estes resultados são semelhantes aos relatados para suínos domésticos em que os diluentes utilizados para a criopreservação de espermatozóides são geralmente acrescido de 20% gema de ovo (GARCIA et al., 2010; SPENCER et al., 2010). Nenhuma diferença foi evidenciada entre os tratamentos em relação a outras características espermáticas. É relatado que, altas concentrações de gema de ovo não interferem nos resultados de vitalidade espermática e morfologia (WALL; FOOTE et al., 1999).

O glicerol é o crioprotetor principal usado para congelar o sêmen obtido de várias espécies, sendo relatado que concentrações abaixo de 2% ou acima de 6% são deletérias, devido à baixa atividade crioprotetora ou a toxicidade espermática, respectivamente (FAHY, 1986). No presente estudo, nenhuma diferença foi evidenciada para a ACP-116C® quando concentrações de 1,5% ou 3% de glicerol foram utilizadas para o sêmen de catetos. Resultados semelhantes foram relatados para suínos domésticos, onde se afirmou que, concentrações relativamente baixas de glicerol (1-3%) são necessárias para a máxima sobrevivência pós-descongelamento. Isto pode ser afirmado devido à crença de que o efeito primário do glicerol sobre o espermatozóide suíno pode ser extracelular (PAQUIGNON, 1985).

Propõe-se que o glicerol, bem como outros crioprotetores penetrantes, que são osmoticamente ativos, alteram o teor de água e causam estresse ao entrar ou sair da célula (BHUR et al., 2001). No caso específico de sêmen de suínos, estas células utilizam glicerol como fonte de carbono, mesmo na presença de outros substratos como a glicose (OSHE et al., 1979). Dessa forma, diluentes adicionados de glicerol e gema de ovo tem um efeito sinérgico, aumentando a sobrevivência pós-descongelamento dos espermatozóides (PAZ et al., 2011). A maior taxa de sobrevivência dos espermatozóides das amostras congeladas, pode, portanto, ser atribuída a uma redução do estresse osmótico, devido à combinação dos crioprotetores adicionados ao diluente.

Em geral, a utilização de aditivos melhora a qualidade do sêmen preservado. Especula-se que o benefício desta associação pode ser atribuída à natureza diferente das moléculas envolvidas em seu efeito. Sendo que a gema de ovo melhora a viabilidade espermática durante o armazenamento (SALOMON; MAXWELL, 2000). A inclusão de glicerol nos diluentes, juntamente com a gema de ovo, tem mostrado um efeito sinérgico de proteção durante o processo de congelação (PACE; GRAHAM, 1974). As concentrações de crioprotetores para a congelação do sêmen, deve ser escolhida de tal forma que os limites de tolerância osmótica das células não sejam excedidos. Tanto a perda da viabilidade celular devido à exposição aos crioprotetores, bem como a sobrevivência celular após congelação e descongelação, e o retorno às condições isosmóticas, deve ser levado em consideração ao projetar protocolos de criopreservação (HOFFMANN et al., 2011).

A presente pesquisa envolve uma tentativa de melhorar o protocolo de congelação de sêmen, visando assim a formação de um banco de germoplasma para catetos. Foi demonstrado que o diluente à base de água de coco, ACP-116C®, pode ser eficientemente utilizado para a criopreservação de sêmen desta espécie. E que a adição de 20% de gema de ovo e 3% de glicerol para este diluente é recomendada, a fim de alcançar melhores resultados para a preservação do sêmen.

2.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R; SOARES, A. E. E. **Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; *Himenoptera:Apoidea*)**. Interciencia 27, 317–21, 2002.

BAILEY, J. L; MORRIER, A; CORMIER, N. **Semen cryopreservation in farm species: an update**. Can J Anim Sci 83, 393–401, 2003.

BAINBRIDGE, D. R; JABBOUR, H. N. **Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review**. Vet Rec 143, 159–168, 1998.

BHUR, M; FISER, P; BAILEY, J; CURTIS, E. **Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes**. J Androl 22, 961–969, 2001.

BLUME, H; MARQUES, J. R. A. P. **Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos [Evaluation of coconut water for the culture and cryopreservation of murid embryos]**. Revista Brasileira de Reprodução Animal 18(3-4), 97-104, 1984.

BODMER, R. E; AQUINO R; PUERTAS P; REYES C; FANG T; GOTTDENKER N. **Manejo y Uso Sustentable de Pecaríes en la Amazonía Peruana**. Occasional Paper of the IUCN. Species Survival Commission. IUCN-Sur, Quito, Ecuador, n.18. 1997.

CARDOSO, R. C. S; SILVA, A. R; SILVA, L. D. M. **Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa**. Anim Reprod 2, 257-262, 2005.

CARDOSO, R. C. S; SILVA, A. R; SILVA, L. D. M; CHIRINÉA, V. H; SOUZA, F.F; LOPES, M.D. **Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay.** Reprod Dom Anim 42, 11–16, 2007.

CASTELO, T. S; BEZERRA F. S. B; SOUZA A. L. P; MOREIRA, M. A. P; PAULA, V. V; OLIVEIRA, M. F; SILVA, A. R. **Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders.** Theriogenology 74, 1060-1065, 2010.

CASTELO, T.S; BEZERRA, F.S. B; LIMA, G. L; ALVES, H. M; OLIVEIRA, I. R. S; SANTOS, E. A. A; PEIXOTO, G. C. X; SILVA, A. R. **Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*).** Cryobiology 61, 275–279, 2010.

CAVALCANTE-FILHO, M. F; MIGLINO, M. A; MACHADO, G. V; BEVILACQUA, E. M. A. F; NEVES, W. C. **Comparative study of the morphology of the stomach of White lipped peccary (*Tayassu pecari*) and of the collared peccary (*Tayassu tajacu*).** Braz J Morph Sci 15, 206-207, 1998.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos.** Zaragoza: Ed. Acribia, 446, 1980.

ENGLAND, G. C. W. **Cryopreservation of dog semen: a review.** J Reprod Fert 47, 243-255, 1993.

FAHY, G. M. **The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology.** Cryobiology 23, 1–13, 1986.

FARSTAD, W. **Semen cryopreservation in dogs and foxes.** Anim Reprod Sci 42, 251-260, 1996.

GARCIA, JC; DOMINGUEZA, J. C; PENA, F. J; ALEGRE, B; GONZALEZ, R; CASTRO, M. J; HABING, G. G; KIRKWOOD, R. N. **Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility.** Animal Reproduction Science 119, 160–165, 2010.

HAMMERSTEDT, R. H; GRAHAM, J. K; NOLAN, J. P. **Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive.** J Androl 11, 73-88, 1990.

HOFFMANN, N; OLDENHOFA, H; MORANDINIC, C; ROHNB, K; SIEMEA, H. **Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing.** Anim Reprod Sci 125, 112–118, 2011.

HOLT, W. V. **Basic aspects of frozen storage of semen.** Anim Reprod Sci 62, 3–22, 2000.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Six species of ungulate mammals are threatened for extinction in Brazil.** Available at <http://www.icmbio.org.br>. 2011.

MANN, T. **Biochemistry of semen.** In: GREEP RO, ASTWOOD EB (ed): Handbook of Physiology. Washington DC, American Physiology Society 5, 321–47, 1975.

MAXWELL, W. M; JOHNSON, L. A. **Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation.** Mol Reprod Dev 46, 408–18, 1997.

MOUSSA, M; MERTINET, V; TRIMECHE, A; TAINTURIER, M; ANTON, M. **Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen.** Theriogenology 57, 1695-1706, 2002.

ÓSHE, T; DACHEAUX, J. L; PAQUIGNON, M. **Metabolism of boar spermatozoa before, during preparation for, and after storage in liquid nitrogen.** J Reprod Fert 55, 277–285, 1979.

PACE, M. M; GRAHAM, E. F. **Components in egg yolk which protect bovine sperm during freezing.** J Anim Sci. 39, 1144–1149, 1974.

PAQUIGNON, M. **Freezing and thawing extenders of boar spermatozoa.** In: L. A, Johnson and K. Larsson (Ed.) Deep Freezing of Boar Semen. Swedish Univ of Agric Sci, Uppsala, Sweden 129-146, 1985.

PAZ, P; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M; NICOLAS, M; ALVAREZ, M; CHAMORRO, M. A; BORRAGA, N. S; MARTINEZ-PASTOR, F; ANEL, L. **Optimization of glycerol concentration and freezing rate in the cryopreservation of ejaculate from brown bear (*Ursus arctos*).** Reprod Dom Anim 2011; doi: 10.1111/j.14390531.2011.01808.x.

SALOMON, S; MAXWELL, W. M. C. **Storage of ram semen.** Anim Reprod Sci 62, 77-111, 2000.

SILVA, A. R; CARDOSO, R. C. S; SILVA, L. D. M; CHIRINEA, V. H; LOPES, M. D; SOUZA, F. F. **Prognostic value of canine frozenthawed semen parameters on in vitro sperm oocyte interactions.** Theriogenology 66, 456–62, 2006.

SILVA, M. A; PEIXOTO, G. C. X; SANTOS, E. A. A; CASTELO, T. S; OLIVEIRA, M. F; SILVA, A. R. **Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders.** Theriogenology 76, 1084–1089, 2011.

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

SOUZA, A. L. P; CASTELO, T. S; QUEIROZ, J. P. A. F; BARROS, I. O; PAULA, V. V; OLIVEIRA, M. F; SILVA, A. R. **Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation.** Anim Reprod Sci 116, 370–375, 2009.

TONIOLLI, R; BUSSIÈRE, J; COUROT, M; MAGISTRINI, M; COMBARNOUS, Y. **Effect of indole-3-acetic (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination.** Reprod Nutr Dev 36, 503–11, 1996.

TONIOLLI, R; TONIOLLO, G. H; FRANCESCHINI, P. H; MORATO, F. M. A. C. **Use of powder coconut water as extender (ACP-103®) for boar semen longer preservation: in vitro and in vivo evaluations.** Braz J Vet Res Anim Sci 62, 1072-1079, 2010.

VIVEIROS, A. T. M; MARIA, A. N; ORFÃO, L. H; CARVALHO, M. A. M; NUNES, J. F. **Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: International Symposium on Reproductive Physiology of Fish.** Saint Malo: France: 232 [abstract], 2007.

WALL, R. J; FOOTE, R. H. **Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk-tris-glycerol extender.** Journal Dairry Science 82, 817-821, 1999.

**3 CAPÍTULO 3 - INTERAÇÕES ENTRE AS TAXAS DE CONGELAÇÃO E
DESCONGELAÇÃO E TAMANHO DE PALHETA SOBRE A
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*)**

**Interactions among freezing-thawing rates and straw size on the cryopreservation
of collared peccary (*Tayassu tajacu*) semen**

M.A. Silva, G. C. X. Peixoto, T. S. Castelo, M. F. Oliveira, E. A. A. Santos, G. L. Lima.

A.R.Silva

A ser submetido.

INTERAÇÕES ENTRE AS TAXAS DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO E TAMANHO DE PALHETA SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*)

3.1 RESUMO

O presente estudo vem buscar melhores métodos que possam ser aplicados a criopreservação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*), testando diferentes curvas de congelamento, volumes de palhetas e temperaturas de descongelamento. Como diluente foi utilizado a Água de Coco em Pó (ACP-116C®), acrescida de 20% de gema de ovo e 3% de glicerol, nunca usada antes na criopreservação do sêmen de catetos. Foram utilizados 12 ejaculados de 8 machos adultos criados em cativeiro, coletados por eletroejaculação, e avaliados quanto a motilidade espermática, vigor, viabilidade, morfologia e funcionalidade e integridade da membrana acrossômica. Após a diluição, as amostras foram divididas em duas alíquotas, destinadas a diferentes curvas de congelamento, A, curva lenta, e B, curva rápida. As amostras foram acondicionadas em palhetas de 0,25 e 0,5mL, durante uma semana, e descongeladas a 37°C/1min e 70°C/8s, em seguida, avaliadas como relatado para o sêmen fresco e também, para a integridade da membrana dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Comparando-se os grupos, não houve declínio na motilidade e vigor ($p > 0,05$) ao se adicionar o diluente. O contrário ocorreu na adição de glicerol ($p < 0,05$). O processo de congelamento e descongelamento, provocou a diminuição das características espermáticas. No entanto, não foram verificadas diferenças entre as curvas de congelamento e volumes de palheta ($p > 0,05$). Porém, foram verificadas diferenças entre o volume das palhetas e a taxa de descongelamento a 70 °C/8s ($p < 0,05$). Em conclusão, recomenda-se a criopreservação do sêmen de cateto em ACP®-116C, usando a curva de congelamento descrita por Chemineau (1991) e Silva (2006), que permite a maximização do tempo durante o processo, e o armazenamento em palhetas de 0,25 ou 0,5mL, e descongelamento a 37 °C/60s.

Palavras-chave: *Tayassu tajacu*, criopreservação, palhetas, descongelamento, água de coco.

3.2 INTRODUÇÃO

O conhecimento do comportamento animal e fisiologia dos mamíferos é extremamente limitado, especialmente no que diz respeito aos parâmetros reprodutivos mais básicos de animais silvestres (WILDT, 2005). Conhecer a biologia reprodutiva do macho e sua fisiologia, é fundamental para a prevenção da extinção de espécies, bem como melhorar a gestão de espécies e aumentar a capacidade reprodutiva dos mesmos em programas de melhoramento natural e artificial (COMIZZOLI et al., 2000). A caça predatória dos catetos tem representado, ao longo do tempo, uma importante fonte de recurso alimentar. Eles estão entre as espécies mais caçadas devido ao interesse comercial por carne e peles (VEIGA et al., 1995), e atualmente, esses animais estão sendo criados em cativeiro com objetivos econômicos, o que pode representar uma importante forma de desenvolvimento sustentável (CRUZ et al., 2009). Além da preservação do habitat, outra medida de conservação que vem sendo adotada, é a criação de bancos genéticos (FICKEL et al., 2007).

Recentemente, foi demonstrado que o sêmen cateto pode ser criopreservado com o uso do diluente Tris-base e descongelado em temperaturas variando de 37 °C a 55 °C (CASTELO et al., 2010). No entanto, as variações de temperatura envolvidas na congelação e descongelação do sêmen reduzem inevitavelmente a proporção de espermatozóides móveis e causa danos estruturais, bioquímicos e ultra-funcionais (SALOMON; MAXWEL, 1995). Por isso a importância de adequar, para o sêmen das diferentes espécies, uma curva de congelação ideal, afim de minimizar esses danos, pois, o processo de congelação, além de buscar evitar o gasto desnecessário de energia espermática, visa proteger e nutrir o espermatozóide para que o mesmo se mantenha viável após a descongelação.

Para manter essa viabilidade, deve-se também considerar o volume da palheta utilizada e a temperatura de descongelação. O uso de palhetas de grande diâmetro proporciona menor taxa de congelação, com um ponto de platô mais frio e maior heterogeneidade dentro da palheta, promovendo um maior percentual de danos nas células (BWANGA et al., 1990, 1991). Porém, a palheta de 0,25 mL tem uma relação de maior volume do que de superfície, como a de 0,5mL (SENGER, 1980), o que aumenta a ocorrência de mudanças pós-descongelação dentro da palheta.

A taxa de descongelação é fundamental na preservação da viabilidade dos espermatozóides. Porém há uma escassez de dados disponíveis em relação às condições

de descongelamento. Geralmente, as taxas de descongelamento devem ser elevadas para evitar a recristalização (LAHNSTEINER, 2000). Quanto maior a relação superfície-volume dos palhetas, haverá uma rápida dissipação de calor latente, que afetará o processo de descongelamento usado (BABIAK; GLOGOWSKI, 1998). Além disso, um procedimento de descongelamento rápido, demanda alta precisão sobre o tempo exato da descongelamento, já que a temperatura final dentro de uma palheta pode alcançar um nível alto o suficiente para causar efeitos deletérios sobre a viabilidade de espermatozoides, se não for cuidadosamente monitorado (SODERQUIST et al.1997).

Assim, o objetivo deste estudo é verificar a ação de diferentes curvas de congelamento, bem como a interação entre os diferentes volumes de palhetas e temperaturas de descongelamento no processo de congelamento e descongelamento, afim de padronizar essas técnicas e aumentar a viabilidade do sêmen de cateto após o processo de criopreservação.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O comitê de ética da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA aprovou os protocolos experimentais, bem como os procedimentos de assistência adotado aos animais (Processo n ° 23091.0253/114). Os reagentes utilizados no presente estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.3.1 Animais

Um total de oito catetos machos sexualmente maduros de, com $40,7 \pm 1,6$ meses de idade e $22,5 \pm 2,8$ kg foram utilizados no estudo. Os animais pertenciam ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres- CEMAS da UFERSA, localizado no Nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil, $5^{\circ} 100''$ S, $37^{\circ} 100''$ W). A região é sujeita a um clima semi-árido típico, com uma temperatura média anual de 27° C. Os animais foram isolados das fêmeas por um período de seis meses antes do início do estudo e foram mantidos sob fotoperíodo natural de 12 h. Posteriormente, foram divididos em grupos de quatro e cinco animais e mantidos em piquetes ao ar livre (20 mx 3 m), com uma área coberta de (3m x 3m). Os animais foram alimentados com uma dieta a base de sementes, frutas e ração para suínos, e a água foi fornecida *ad libitum*.

3.3.2 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum por 12h antes de iniciar os experimentos. Então foram contidos fisicamente com o auxílio de um puçá e anestesiados com a administração intravenosa de propofol (Propovan ®, Cristalia, Fortaleza, Brasil), dado em bolus (5 mg / kg) (SOUZA et al., 2009). Quando o animal apresentou sinais de despertar, foram administradas doses adicionais de propofol (cerca de 1,25 mg / kg), dada para prolongar a anestesia. Durante o procedimento, um cateter venoso foi introduzido na veia cefálica para a fluidoterapia (0,9% soro fisiológico), e os parâmetros fisiológicos foram monitorados.

3.3.3 Coleta de sêmen

Os animais foram mantidos em decúbito lateral, e o sêmen foi obtido utilizando um electroejaculator (Autojac ®, Neovet, Campinas, SP, Brasil) conectado a uma fonte de 12 V. O ciclo de estimulação incluiu 10 estímulos em cada tensão, a partir de 5 V, e seguido por um aumento de tensão, de 1 V até 12 V. Cada estímulo elétrico durou 3s, com intervalos intermitentes de 2s. O ciclo de estímulos foi mantido por um período de 10 min a partir do início do procedimento. A sonda do electroejaculator media 15 cm de comprimento e 1,3 cm de diâmetro; um comprimento de 12 cm foi inserido no reto (CASTELO et al., 2010, a,b). O sêmen foi colhido em tubos de plástico e imediatamente avaliado.

3.3.4 Avaliação de sêmen

Só foram utilizadas as amostras de sêmen com motilidade superior a 80% e vigor igual ou acima de 4. O volume de sêmen foi medido por micropipetas, e a cor do sêmen foi avaliada. Motilidade, vigor (0 -5) foram avaliados imediatamente pela avaliação de uma amostra (5µL) sob microscopia de luz a 100 e 400x de ampliação. Lâminas utilizando o corante Azul de Bromofenol (DERIVAUX, 1980) foram preparadas com 5 mL de sêmen para avaliar a viabilidade e morfologia espermática e integridade acrossômica em microscopia de luz (1000×), com contagem de 200 células por lâmina. Os defeitos morfológicos detectados foram classificados como primários ou secundários. Após a avaliação inicial, uma líquota de 5 µL de sêmen foi diluída em formol tamponado a 10% (1 mL) e a concentração espermática foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer para contagem. A integridade funcional da membrana espermática foi avaliada através do teste hiposmótico (HOST), usando água destilada (0 mOsm / L) como a solução hiposmótica (MOUSSA et al., 2002). Uma alíquota (0,01 mL) de sêmen foi diluído em 0,09 mL de solução hiposmótica e mantida em banho-maria a 38 ° C. Após 45 min, uma alíquota da solução foi colocada sobre uma lâmina de vidro, coberto por uma lamínula, e avaliada com auxílio de microscopia de contraste de fase (400x), contando 200 células. Os espermatozóides com caudas enroladas e inchaço foram considerados com membrana funcional.

3.3.5 Diluentes e procedimentos de congelação e descongelação

O ACP ® utilizado no experimento foi registrado como ACP-116C ® para uso na criopreservação do sêmen catetos. ACP-116C ® é composto de água de coco desidratado e reguladores de pH. Um frasco de ACP-116C ® contém 12 g do produto, que deve ser diluído com 50 mL de água destilada de acordo com a recomendação do fabricante (ACP®-Biotecnologia, Fortaleza, Brasil). Após a reconstituição, o pH do diluente foi de 7,4, com uma osmolaridade de 307 mOsm/kg.

As amostras de sêmen foram diluídas em ACP®-116C acrescido de 20% de gema de ovo e dividido em duas alíquotas. A primeira alíquota (controle - A) foi submetido a um protocolo de congelação lento descrito para suínos domésticos (SELLÉS et al. 1991) e usado em catetos (CASTELO et al., 2010). Neste protocolo, a alíquota foi armazenada em tubo de plástico colocado dentro de copos plástico com água (30 mL) a 27 °C e equilibrada por 240 min para chegar a 5 °C em caixa isotérmica.

A segunda alíquota (B) foi submetida a um protocolo anteriormente utilizado para ruminantes (CHEMINEAU et al, 1991; SILVA et al, 2006). Onde a amostra foi armazenada em tubo plástico, dentro de copo com água, armazenada a 15 °C e equilibrada por 40 min. Além disso, ele foi transferida para uma incubadora biológica de oxigênio (Quimis; Diadema, SP, Brasil) por 30 min para chegar a 5 °C.

Ao alcançar 5 °C, ambas as alíquotas (A e B) foram adicionadas do diluente contendo de 6% de glicerol (também a 5 °C), o que resultou em uma concentração final de glicerol de 3% no meio. Para todas as amostras, a diluição final resultou em uma concentração espermática de 100×10^6 espermatozoides/mL. A motilidade e o vigor foram avaliados imediatamente após a adição de glicerol.

As amostras do mesmo animal, usando ambos os protocolos de congelação, foram divididos e acondicionadas em palhetas de 0,25 e 0,5mL (IMVTechnologies; L'Aigle, França), colocadas em vapor de nitrogênio, e em seguida mergulhadas em N₂ para armazenamento. As alíquotas submetidas ao protocolo lento de congelação (A) foram colocadas horizontalmente em uma rampa 3cm acima do nitrogênio líquido, contida numa caixa térmica por 20 min; as outras alíquotas submetidas ao protocolo de congelação rápida (B) também foram colocadas horizontalmente em uma caixa isolada, mas por 5 min, a 5 cm acima do nitrogênio líquido. Finalmente, as palhetas foram mergulhados em N₂ líquido para armazenamento.

Depois de uma semana, ambas as palhetas, de 0,5 e 0,25mL de cada animal foram descongeladas em banho-maria, a 37°C/1min, ou a 70 °C/8 s, seguido de mais 30s a 37°C. O sêmen foi imediatamente avaliado, como relatado para o sêmen fresco. Além

disso, a integridade da membrana plasmática foi avaliada por sondas fluorescentes como será descrito adiante.

3.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides após a descongelação

A integridade da membrana plasmática foi avaliada com uma solução de fluorescência que continha os fluoróforos 6-diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). Inicialmente, amostras frescas de ejaculado foram utilizadas para padronizar os protocolos de avaliação de sêmen de catetos. Uma alíquota de 10µL de sêmen descongelado foi adicionada em 40µL de solução fluorescente. Após 10 minutos, alíquotas das amostras coradas foram avaliadas por microscopia de epifluorescência (Leica - Episcopic Fluorescent Attachment "EFA" Set lâmpada halógena, Suécia). Para cada amostra corada com CFDA/PI, foram contadas 200 espermatozóides e classificados como tendo ou não um plasmalema intacta com base na cor. As membranas celulares corados em verde (CFDA) foram consideradas intactas, enquanto que aquelas coradas em vermelho (PI) ou parcialmente coradas foram consideradas como não-intactas (SILVA et al., 2006).

3.3.7 Análise estatística

Um total de 12 repetições foram realizadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade pelo teste de Levene, utilizando o Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, EUA). Os valores expressos em percentuais foram transformados em arco seno. Comparações entre diferentes diluentes sobre os parâmetros seminais foram feitas por análise de variância seguida do teste-t de Student. O efeito dos diluentes no vigor espermático foi avaliado pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

Um total de 15 tentativas para coleta de sêmen foram realizadas em oito animais. Dos ejaculados, apenas doze foram utilizados, os outros três ejaculados não foram

utilizados no experimento, devido ao baixo volume, motilidade, ou vigor. Em relação aos ejaculados incluídos no experimento, dois foram coletados a partir de um macho, quatro amostras foram coletadas a partir de outro indivíduo, e seis animais foram coletados apenas em uma ocasião. Os doze ejaculados utilizados possuíam cor branca e aspecto aguado. As demais características seminais estão expressas na Tabela 1.

Foi observado em ambos os grupos, que não houve declínio na motilidade e vigor ($p > 0,05$) ao se adicionar o diluente. O contrário ocorreu na adição de glicerol ($p < 0,05$), com redução significativa da motilidade e vigor em todas as amostras (Tabela 2).

O processo de congelação e descongelação, provocou a diminuição das características espermáticas de todos os tratamentos (Tabela 3). No entanto, não foram verificadas diferenças entre as curvas de congelação e volumes de palheta ($p > 0,05$). Mas, foram verificadas diferenças entre o volume de palhas e as taxas de descongelação a 70 °C/8s ($p < 0,05$). A avaliação da integridade de membrana foi realizada somente nas amostras descongeladas a 37°C, devido a baixa sobrevivência espermática observada imediatamente após a descongelação das amostras a 70°C.

Tabela 4.

Características espermáticas do sêmen fresco de catetos (*Tayassu tajacu*) coletado por eletroejaculação. (n = 12 ejaculados).

	Média ± DP	Variação
Volume (mL)	6,8 ± 1,3	1 – 14,8
Concentração espermática (x10 ⁶)	978,3 ± 118,7	780 – 1680
Motilidade espermática (%)	91,3 ± 1,9	85 – 95
Vigor (0-5)	4,7 ± 0,1	4 – 5
Viabilidade espermática (%)	89,7 ± 1,2	80 – 94
Integridade funcional da membrana (%)	79,2 ± 3,4	52 – 93
Morfologia espermática		
Normal (%)	77 ± 4,7	44 – 96
Defeitos primários (%)	1,5 ± 0,8	0,0 – 2,3
Defeitos secundários (%)	21,5 ± 3,8	4,0 – 56
Defeitos totais (%)	23,0 ± 4,7	4,0 – 56

Tabela 5.

Média $\pm$ DP da motilidade espermática e vigor do semen fresco, diluído e glicerolizado de cateto (*Tayassu tajacu*), em diluente ACP-116c[®] (n=12), usando procedimento de congelação curto e longo.

Sêmen	Protocolo de congelação	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
Fresco		91,25 $\pm$ 1,9 ^a	4,67 $\pm$ 0,14 ^a
Diluído		81,67 $\pm$ 3,4 ^a	4,17 $\pm$ 0,17 ^a
Glicerolizado	Lento	63,75 $\pm$ 3,95 ^b	3,0 $\pm$ 0,17 ^b
	Rápido	67,92 $\pm$ 3,67 ^b	3,17 $\pm$ 0,2 ^b

^{a, b} Na mesma coluna, subscritos diferentes correspondem a diferença estatística significativa (p < 0,05).

Tabela 6.

Características pós-descongelamento do sêmen de catetos (n=12), diluído em água de coco em pó (ACP-116c®) submetido a diferentes curvas de congelamento (A, lenta e B, rápida), volumes de palheta (0,25 e 0,5ml) e temperaturas de descongelamento (37°C/60 s e 70°C/8s).

	ACP A/0,25ml/37°C	ACP A/0,25ml/70°C	ACP A/0,5ml/37°C	ACP A/0,5ml/70°C	ACP B/0,25ml/37°C	ACP B/0,25ml/70°C	ACP B/0,5ml/37°C	ACP B/0,5ml/70°C
Motilidade espermática (%)	35,83 ± 6,33 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	38,75 ± 6,86 ^{a,c,e}	9,58 ± 4,78 ^{b,c,d,f}	42,08 ± 8,08 ^{a,c}	0,85 ± 0,24 ^{b,d}	41,67 ± 6,58 ^{a,c,e,g}	20,0 ± 8,16 ^{a,c,d,e,f,h}
Vigor (0-5)	2,67 ± 0,25 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	2,5 ± 0,15 ^{a,c,e}	0,92 ± 0,4 ^{b,c,d,f}	2,75 ± 0,33 ^{a,c}	0,25 ± 0,25 ^d	2,84 ± 0,17 ^{a,b,c,e,g}	1,42 ± 0,43 ^{b,c,d,e,h}
Viabilidade espermática (%)	42,92 ± 4,73 ^a	17,0 ± 3,9 ^b	36,34 ± 3,73 ^a	27,42 ± 4,11 ^a	35,58 ± 5,42 ^a	19,84 ± 4,0 ^b	37,75 ± 5,6 ^a	34,5 ± 5,67 ^a
Teste hiposmótico(%)	29,67 ± 1,8 ^a	16,5 ± 2,53 ^{b,c}	26,67 ± 4,31 ^{a,g}	19,25 ± 3,23 ^a	29,84 ± 3,58 ^{a,e}	19,34 ± 6,64 ^{a,f}	9,34 ± 4,21 ^{b,d}	0,208 ± 0,02 ^{b,d}
Integridade da membrana(%)	24,25 ± 6,2 ^a	-	31,72 ± 7,8 ^a	-	22,75 ± 4,2 ^a	-	15,76 ± 3,5 ^a	-
Morfologia espermática								
Normal (%)	53,91 ± 7,73 ^a	72,67 ± 4,59 ^a	60,67 ± 7,64 ^a	60,0 ± 7,53 ^a	58,17 ± 8,03 ^a	65,75 ± 6,8 ^a	64,42 ± 5,62 ^a	65,84 ± 6,43 ^a
Defeitos primários(%)	2,73 ± 1,82 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	4,43 ± 0,85 ^a	1,48 ± 1,2 ^a	3,19 ± 1,54 ^a	1,17 ± 1,12 ^a	4,04 ± 1,84 ^a	0,67 ± 2,56 ^a
Defeitos secundários(%)	43,35 ± 1,03 ^a	27,67 ± 4,6 ^a	35,07 ± 0,85 ^a	38,52 ± 1,6 ^a	38,64 ± 1,54 ^a	33,08 ± 1,24 ^a	31,54 ± 1,84 ^a	32,67 ± 2,56 ^a
Defeitos totais (%)	46,08 ± 7,73 ^a	27,67 ± 4,6 ^a	39,34 ± 7,65 ^a	40,0 ± 7,53 ^a	41,83 ± 8,03 ^a	34,25 ± 6,8 ^a	35,58 ± 5,62 ^a	33,34 ± 6,66 ^a

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Na mesma coluna, subscritos diferentes correspondem a diferença estatística significativa (p < 0,05),

3.5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observada uma influência da temperatura de descongelação sobre as amostras, não havendo diferença no uso da curva de congelação e do volume da palheta usados para a criopreservação. Castelo et al., (2010), testaram diferentes temperaturas de descongelação no sêmen de catetos; 37 °C por 1min ou 55 °C por 7s, seguido de um adicional 30s a 37 °C, utilizando Tris-frutose e Tris-glicose como diluentes, não observando diferença entre as amostras ($p \geq 5$).

Na presente pesquisa, observou-se que todas as amostras sofreram uma redução nos parâmetros seminais após a descongelação ($p \leq 0,05$). Uma das causas desta ocorrência, é que durante a remoção de um crioprotetor, as células incham, inicialmente, devido a um influxo de água e, lentamente, voltam ao volume normal quando o crioprotetor e a água saem da célula. As mudanças na osmolalidade da solução podem resultar em uma significativa perda de integridade funcional, tais como a motilidade dos espermatozóides, ou mesmo a morte celular sem perda de integridade da membrana plasmática (HOLT; ABAIGAR; JABBOUR, 1996).

Watson (1995), tem a hipótese de que as mudanças na temperatura que ocorrem durante a congelação e descongelação dos espermatozóides, produzem modificações na membrana espermática, semelhantes as mudanças que ocorrem durante a capacitação. Portanto, a composição do diluente e os crioprotetores utilizados, são fatores importantes para o sucesso na criopreservação de sêmen (SALAMON, MAXWELL, 2000; VERSTEGEN, OCLIN, IGUER-OUADA, 2005). Portanto, o uso de agentes crioprotetores é essencial para a viabilidade dos espermatozóides após a descongelação, com o intuito de minimizar a formação de gelo intracelular e restringir o efeito da solução (GARDE et al., 2008).

Para Travers et al. (2011) para limitar o risco de crio-lesão, três pontos principais devem ser definidos em um protocolo de congelação: o meio de criopreservação em que as amostras serão equilibradas antes da congelação, que deve conter crioprotetores penetrantes, para limitar a formação de gelo intracelular, e não-penetrantes, que reduzem a formação de gelo extracelular; o tempo e temperatura de incubação dos agentes crioprotetores, a baixa concentração não vai impedir a formação de cristais de gelo, e o excesso será prejudicial, tanto por um efeito tóxico direto, ou pela desidratação celular excessiva induzida pelas mudanças osmóticas (WOELDERS; CHAVEIRO, 2004), e o tipo de protocolo de congelação, controlada ou não controlada, lenta ou rápida. A taxa de resfriamento rápido irá limitar o “efeito-solução”, mas vai induzir a formação de cristais de gelo onde a taxa de resfriamento mais lenta, irá reduzir a formação de cristais.

Foram testadas diferentes curvas de congelação (SELLÉS et al 2003;. CHEMINEAU et al, 1991, SILVA et al, 2006.), que não diferiram em sua aplicação. O efeito da taxa de congelação sobre os aspectos biológicos foi descrito em detalhes por Mazur (1970; 1977). Na temperatura sub-zero, taxas de congelação lenta resultam em células para desidratar e compensar a maior concentração de solutos extracelular devido à formação de gelo. Consequentemente, a concentração de soluto intracelular aumenta levando a choque osmótico (efeito de solução). Taxas de congelação rápida, no entanto, resultam em células que não têm tempo suficiente para desidratar levando à formação de gelo intracelular durante a congelação (ANZAR, KROETSCH, BOSWALL, 2011). Uma típica relação de U invertido existe entre a sobrevivência da célula e taxa de congelação (MAZUR et al., 1972). Portanto, uma taxa de congelação ideal deve ser lenta o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular e rápida o suficiente para minimizar o choque osmótico (MAZUR, 1970). A taxa de congelação espermática ideal

varia entre diferentes espécies, ou seja, -50 °C/min a -100°C/min, para touros (WOELDERS et al., 1997); -15 °C/min até -60°C/min para ovinos (BYRNE et al., 2000; ANEL et al., 2003), e -30 °C/min até -60°C/min para suínos (FISER; FAIRFULL, 1990).

O procedimento de congelação e descongelação induzem uma diminuição da viabilidade dos espermatozóides (PURSEL et al., 1978). Tal redução pode ser minimizada por meio da otimização de diferentes etapas envolvidas no processo. Um aumento na taxa de descongelação tem demonstrado reduzir a recristalização de gelo intracelular, um processo que pode levar à formação de cristais de gelo maiores e mais estáveis que danificam as mitocôndrias (COURTENS; PAQUIGNON, 1985; FISER; FAIRFULL, 1990). Por outro lado, o aquecimento rápido pode induzir o estresse osmótico sobre os espermatozóides, devido ao derretimento abrupto da solução extracelular, que pode causar o desequilíbrio das taxas de influxo de água e saída do crioprotetor, podendo causar inchaço e lise de células (HAMMERSTEDT et al. , 1978; MAZUR, 1984). Além desses fatores, o padrão de resfriamento e início da cristalização do gelo depende das palhetas (JOHNSON et al. 2000), pois a sua configuração geométrica fornece flexibilidade durante esse processo (PACE et al. 1981).

Testamos diferentes volumes de palhetas, 0,25 e 0,5 mL, e não foi observada diferença entre os parâmetros das amostras, após o descongelamento ($p > 5$). A relação superfície-volume tem implicações importantes para o resfriamento, congelação e taxas de descongelação (MAXWELL et al. 1995). No entanto, palhetas de 0,25 mL têm maior relação de troca superfície-volume (SENGER et al., 1983), assim, o calor é mais uniforme e mais rápido durante a congelação, em comparação com as palhetas de 0,5mL. Porém, palhetas de 0,25 ml são mais sensíveis fisicamente ao choque térmico

(STEVENSON et al., 2009). Assim, um cuidado deve ser tomado durante sua remoção do tanque de nitrogênio líquido e durante o manuseio durante a descongelação.

Estudos anteriores documentaram um aumento pequeno na fertilidade de vacas utilizando palhetas de 0,25 ml (KROETSCH, 1992; JOHNSON et al, 1995; KAPROTH et al, 2005). Uma análise de 15 estudos revelou uma maior probabilidade de fecundidade (3-4%) utilizando sêmen congelado em palhetas de 0,25 ml em comparação com palhetas de 0,5 ml, com uma diferença real de 0,74% (STEVENSON et al., 2009). Além disso, palhetas de 0,25 ml são mais econômicas com maior capacidade de armazenamento, em comparação as palhetas de 0,5 ml (KROETSCH, 1992; JOHNSON et al, 1995). Na cutia (*Dasyproscata agouti*), Silva et al., 2011 observaram um efeito negativo da interação entre a palheta de 0,5 mL e a descongelação a 70 °C/8s sobre o vigor dos espermatozoides do epidídimo. Acredita-se que, quando as palhetas de 0,50 mL são expostas a altas temperaturas, as células são submetidas a uma taxa de degelo não homogênea, que pode causar uma ativação incompleta do movimento em algumas células no centro da palha, levando a uma redução na vigor espermático. Buranaamnuay et al., (2009) considera que em amostras congeladas e descongeladas, a qualidade do sêmen armazenado em palheta de 0,5 mL não deve ser melhor do que as de 0,25 mL quando se utiliza o mesmo protocolo de congelação e descongelação.

Em conclusão, é recomendado que o sêmen de cateto criopreservado em ACP® -116C, pode ser melhor criopreservado usando a curva de congelação rápida, que permite a maximização do tempo durante o processo, e o armazenamento em palhetas de 0,25 ou 0,5mL, para ser descongelado futuramente a temperatura de 37 °C/60s.

3.6 REFERÊNCIAS

ANEL, L; PAZ, P. D; ÁLVAREZ M; CHAMORRO, C. A; BOIXO, J. C; MANSO, A; GONZÁLEZ, M; KAABI, M; ANEL, E. **Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen.** Theriogenology 60, 1293–1308, 2003.

ANZAR M., KROETSCH, T; BOSWALL, L. **Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes.** Ani. Rep. Sci. 126, 23-31, 2011.

BABIAK I, GLOGOWSKI J. **Cryopreservation of sperm from a *sp Aspius aspius*.** Prog. Fish. Cult. 60, 146–8, 1998.

BWANGA, C. O; DE BRAGANÇA, M. M; EINARSSON, S; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Cryopreservation of boar semen in mini and maxi-straws.** Zentralbl. Veterinaarmed, 37, 651–658, 1990.

BWANGA, C.O., EINARSSON, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Cryopreservation of boar semen: II. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini and maxi-straws and plastic bags.** Acta Vet. Scand. 32, 455–46, 1991.

BYRNE, G.P; LONERGAN, P; WADE, M; DUFFY, P; DONOVAN, A; HANRAHAN, J.P; BOLAND, M. P. **Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro.** Anim. Reprod. Sci. 62, 265–275, 2000.

CASTELO, T. S; BEZERRA, F. S. B; LIMA, G. L; ALVES, H. M; OLIVEIRA, I. R. S; SANTOS, E. A. A; PEIXOTO, G. C. X; SILVA, A. R. **Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*).** Cryobiology 61, 275–279, 2010a.

CASTELO, T. S; BEZERRA, F. S. B; SOUZA, A. L. P; MOREIRA, M. A. P; PAULA, V. V; OLIVEIRA, M. F; SILVA, A. R. **Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders.** Theriogenology 74, 1060-1065, 2010b.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. 1991. In, CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. Theriogenology, v.64, p.457-468, 2005.

COMIZZOLI, P; MERMILLOD, P; MAUGET, R. **Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species.** Reprod. Nutr. Dev. 40, 493–504, 2000.

COURTENS, J. L; PAQUIGNON, M. **Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar.** In: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds.), Deep Freezing of Boar Semen. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 61–87, 1985.

CRUZ, M. P; WARKEN, L. J; SOUZA, D. C; TEIXEIRA, V. L. B; NASCIMENTO JUNIOR, A. F. **Estudo do cateto (*Tayassu tajacu*) e queixada (*Tayassu pecari*) no Parque Municipal das Araucárias (Guarapuava- Paraná) : Regime semicativeiro.** Universidade Paranaense-UNIPAR, 2009.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos.** Zaragoza: Ed. Acribia, 446, 1980.

FICKEL, J; WAGENER, A; LUDWIG, A. **Semen cryopreservation and the conservation of endangered species.** Eur J Wildl Res, 53, 81–89, 2007.

FISER, P.S; FAIRFULL, R.W. **Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws.** Mol. Reprod. Dev. 25, 123–129, 1990.

HAMMERSTEDT, R. H; KEITH, A. D; SNIPES, W. C; AMANN, R. P; ARRUDA, D; GRIEL, J. R. L.C. **Use of spin labels to evaluate effect of cold shock and osmolarity on sperm.** Biol. Reprod. 18, 686–696, 1978.

HOLT, W. V; ABAIGAR, T; JABBOUR, H. N. **Oestrus synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor Gazelle (*Gazelladamamhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme.** Reprod. Fertil. Dev. 8, 1215–22, 1996.

JOHNSON, L. A; WEITZE, K. F; FISER, P; MAXWELL, W. M. C. **Storage of boar semen.** Anim. Reprod. Sci. 62,143–172, 2000.

JOHNSON, M. S; SENGER, P. L; ALLEN, C. H; HANCOCK, D. D; ALEXANDER, B. M; SASSER, R. G. **Fertility of bull semen packaged in 0.25 and 0.5 milliliter French straws.** J. Anim. Sci. 73, 1914–1919, 1995.

KAPROTH, M. T; RYCROFT, H. E; GILBERT, G. R; ABDEL-AZIM, G; PUTNAM, B. F; SCHNELL, S. A; EVERETT, R. W; PARKS, J. E. **Effect of semen thaw method on conception rate in four large commercial dairy heifer herds.** Theriogenology 63, 2535–2549, 2005.

KROETSCH, T. **Experiences with mini-straws.** In: **14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction** ,Milwaukee, WI, 64–67, 1992.

LAHNSTEINER, F. **Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike.** Aquaculture Research 31, 245–258, 2000.

MAZUR, P. **Freezing of live cells: mechanisms and implications.** Am. J. Physiol. 247, 125–142, 1984.

MAZUR, P. **The freezing of biological systems.** Cryobiology, 168, 939–949, 1970.

MAZUR, P. **The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates.** Cryobiology, 14, 251–272, 1977.

MAZUR, P; LEIBO, S. P; CHU, E. H. **A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells.** Exp. Cell. Res. 71, 345–355, 1972.

MOUSSA M, MERTINET V, TRIMECHE A, TAINURIER M, ANTON M. **Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen.** Theriogenology 57, 1695-1706, 2002.

PACE, M. M; SULLIVAN, J. J; ELLIOTT, F. I; GRAHAM, E. F; COULTER, G. F. **Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5mL French straws.** J. Anim. Sci. 53, 693–701, 1981.

PURSEL VG, SCHULMAN LL, JOHNSON LA. **Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm.** J. Anim. Sci. 47, 198 –202, 1978.

RITAR AJ, SALAMON S. **Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa.** Small Rumin. Res. 4, 29 –37, 1991.

SALAMON, S; MAXWELL, W. M. C. **Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (review).** Anim. Reprod. Sci. 37, 185–249, 1995.

SALAMON, S; MAXWELL, W. M. **Storage of ram semen.** Anim. Reprod. Sci. 62, 77–111, 2000.

SELLÉS, E; GADEA, J; ROMAR, R; MATÁS, C; RUIZ, S. **Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility.** Reproduction in Domestic Animals, 38, 66-72, 2003.

SENGER, P. L. **Handling frozen bovine semen-factors which influence viability and fertility.** Theriogenology, 13:51, 1980.

SENGER, P.L., MITCHELL, J.R., ALMQUIST, J.O. **Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 0.25 and 0.5 ml French straws.** J. Anim. Sci. 56, 1261–1268, 1983.

SILVA AR, CARDOSO RCS, SILVA LDM, CHIRINEA VH, LOPES MD, SOUZA FF. **Prognostic value of canine frozenthawed semen parameters on in vitro sperm oocyte interactions.** Theriogenology, 66, 456–62, 2006.

SILVA, M. A; PEIXOTO, G. C. X; SOUSA, P. C; BEZERRA, F. S. B; SIMÃO, B. R; BEZERRA, A.C. D. S; SILVA, A. R.. **Interactions between Straw Size and Thawing Rates on the Cryopreservation of Agouti (*Dasyprocta aguti*) Epididymal Sperm.** Reprod Dom Anim doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01817.x

SOUZA, A. L. P; CASTELO, T. S; QUEIROZ, J. P. A. F; BARROS, I. O; PAULA, V. V; OLIVEIRA, M. F; SILVA, A. R. **Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation.** Anim Reprod Sci. 116, 370–375, 2009.

TRAVERS, A; MILAZZO, J. P; PERDRIX, A; METTON, C; BIRONNEAU, A; MACÉ, B; RIVES, N. **Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue.** Theriogenology, 76, 981-90, 2011.

VEIGA, J. B; TOURRAND, J. F; QUANZ, D. **Agropecuária na Transamazônica. O caso do Município de Uruará. Documento de Pesquisa.** Belém, PA: EMBRAPA 54, 1995.

VERSTEGEN JP, ONCLIN K, IGUER-OUADA M. **Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies.** Theriogenology, 64, 720 –33, 2005.

WATSON, P. F. **Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their postthawing function.** Reprod. Fertil. Dev. 7, 871–91, 1995.

WILDT, D. E. **Lions, tigers, and pandas, oh my.** J. Androl. 26, 452–445, 2005.

WOELDERS, H; CHAVEIRO, A. **Theoretical prediction of ‘optimal’ freezing programmes.** Cryobiology, 49, 258 –71, 2004.

WOELDERS, H; MATTHIJS, A; ENGEL, B. **Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing.** Cryobiology, 35, 93–105, 1997.

4 PERSPECTIVAS

- I. Testar a ação de outros crioprotetores adicionados a Água de Coco em Pó;
- II. Avaliar a ação de outros marcadores fluorescentes na avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática e acrossomal;
- III. Validar o uso da Água de Coco em Pó na criopreservação do sêmen de outras espécies silvestres.

ANEXOS

ANEXO 01 - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “**CRYOPRESERVATION OF COLLARED PECCARIES (*TAYASSU TAJACU*) SEMEN USING A POWDERED COCONUT WATER (ACP-116C®) BASED EXTENDER PLUS DIFFERENT EGG YOLK AND GLYCEROL CONCENTRATIONS**” À REVISTA *THERIOGENOLOGY*.

Dear Dr. Silva,

Your submission entitled "Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c®) based extender plus different egg yolk and glycerol concentrations" has been received by Theriogenology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Theriogenology

ANEXO 02 - CRYOPRESERVATION OF COLLARED PECCARIES (*TAYASSU TAJACU*) SEMEN USING A POWDERED COCONUT WATER (ACP-116C[®]) BASED EXTENDER PLUS DIFFERENT EGG YOLK AND GLYCEROL CONCENTRATIONS

Original do trabalho: Criopreservação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*) usando diluente a base de água de coco em pó (ACP-116C[®]) acrescido de gema de ovo e glicerol em diferentes concentrações. Submetido para publicação na Theriogenology.

Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c[®]) based extender plus different egg yolk and glycerol concentrations

M.A. Silva¹, G. C. X. Peixoto¹, G. L. Lima¹, J. A. B. Bezerra¹, L. B. Campos¹, A.L.C.

Paiva², V.V. Paula², A.R.Silva^{1*}

¹ Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, BR 110, Km 47, Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil.

² Department of Animal Sciences, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

Abstract

The present study is aimed at evaluating the efficiency of a powdered coconut water-based extender (ACP-116c®) plus different egg-yolk and glycerol concentrations, as an alternative for the cryopreservation of collared peccary semen. A total of twelve ejaculates were obtained from captive adult males by electroejaculation, which were further evaluated for sperm motility, vigor, viability, morphology, and acrosome and functional membrane integrity. The ejaculates were fractioned in aliquots that were diluted in Tris plus 10% egg yolk and 3% glycerol or in ACP-116C® plus different concentrations of egg yolk (10 or 20%) and glycerol (1.5 and 3%). The samples were frozen in liquid nitrogen, thawed after one month at 37 °C for one min, and evaluated as reported for fresh semen, and also for sperm membrane integrity using fluorescent probes. It was observed that the freezing and thawing procedures induced a decrease in the sperm characteristics when fresh semen was taken as reference. Regarding the comparison among groups, it was verified that ACP-116C® plus 20% egg yolk and 3% glycerol provided better results for sperm motility and vigor after thawing than when compared to Tris extender ($P < 0.05$). However, no differences were verified among treatments with regard to the other sperm characteristics ($P > 0.05$). In conclusion, a coconut water-based extender, ACP-116C®, plus 20% egg yolk and 3% glycerol can be efficiently used for the cryopreservation of collared peccaries semen.

Keywords: *Tayassu tajacu*; Semen; Cryopreservation; Coconut water

1. Introduction

For several years, the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) have been under constant threat of predatory hunting in Latin American countries [1]. As a result, these animals have been recently classified as vulnerable to extinction in Brazil, and are in particular considered as critically threatened in the Caatinga and Atlantic Forest biomes [2]. The development of protocols for the storage of collared peccary semen would allow the formation of germplasm banks and thereby its use in captive breeding programs. Nevertheless, the literature on sperm cryopreservation in this specie is still scarce, and only Tris-based extenders have been used for this purpose until now [3,4].

The use of coconut water-based extenders has been proposed in the search for alternative semen extenders that are non-toxic, buffering, low cost, practical and effective [5]. Coconut water is a solution composed of salts, proteins, sugars, vitamins, neutral fats, inducers of cell division and various electrolytes, which provides the nutrients necessary for the preservation of cells [6]. The coconut water extender in powdered form (ACP[®], ACP Biothecnology, Fortaleza, Brazil) thus emerges as an alternative for use in semen technology, which allows its use even in regions where the fruit of *Cocus nucifera* does not occur naturally [7]. The ACP[®] was demonstrated as an efficient extender for the conservation of sperm obtained from various species such as dogs [7], fishes [8], boars [9], and agoutis [10]; however, there is no such report in the collared peccary specie.

Glycerol is the most common cryoprotectant employed in different species for semen cryopreservation, including the collared peccary [3,4]. The ideal glycerol concentration in the extender represents a balance between its toxic and protecting

effects, as high concentrations can also affect the fertilizing capacity of the sperm [11]. In addition, the hen's egg yolk has been added to the semen extenders for protecting the sperm membrane, by restoring the phospholipids lost during thermal shock that occurs during the initial cooling of semen [12]. As it also has a buffering capacity, the amount of egg yolk in the media varies according to the buffering capacity of the other components of the extender [13].

The present study is aimed at evaluating the efficiency of a powdered coconut water-based extender (ACP-116c[®]) plus different egg-yolk and glycerol concentrations, as an alternative for the cryopreservation of collared peccary semen.

2. Materials and methods

The ethics committee of the UFERSA has approved the experimental protocols as well as the animal care procedures adopted (Process n° 23091.0253/114). The reagents used in the present study were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.1. Animals

A total of nine sexually mature male collared peccaries of age 40.7 ± 1.6 months and weight 22.5 ± 2.8 kg were included in the study. The animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals from UFERSA, located in northeast Brazil (Mossoró, RN, Brazil; 5° 100' S, 37° 100' W). The region is subject to a typical semi-arid climate with an average annual temperature of 27 °C. The animals were isolated from the females for a period of six months prior to the commencement of the study and

were kept under a 12 h natural photoperiod. Subsequently, they were divided into groups of four and five animals and maintained outdoors in paddocks (20 m x 3 m) with a covered area of (3 m x 3 m). The animals were fed on a diet of sow food and fruits, and water was provided *ad libitum*.

2.2. Anesthesia

The animals were kept in fasting condition for 12 h prior to starting the experiments. They were then physically restrained using a hand net and anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan®, Cristalia, Fortaleza, Brazil), given as a bolus (5 mg/kg) [14]. When the animal showed signs of awakening, additional propofol (approximately 1.25 mg/kg) was given to prolong the anesthesia. During the procedure, an indwelling venous catheter was inserted into the cephalic vein for fluid therapy (0.9% physiological saline solution), and the physiologic parameters were monitored.

2.3. Semen collection

The animals were kept in lateral recumbency, and semen was collected using an electroejaculator (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brazil) connected to a 12 V source. The stimulatory cycle included 10 stimuli in each voltage, starting from 5 V, and followed by a voltage increase in steps of 1 V up to 12 V. Each electrical stimulus lasted for 3 s, with intermittent breaks of 2 s. The stimuli cycle was maintained for a duration of 10-min from the beginning of the procedure. The electroejaculator probe measured 15 cm in length and 1.3 cm in diameter; a length of 12 cm was inserted into

the rectum of the male [3,4]. The semen was collected in plastic tubes and immediately evaluated.

2.4. Semen evaluation

The semen volume was measured by micropipettes, and the color of the semen was noted. Sperm motility and vigor (0 –5) were assessed immediately by evaluating a sample (5 μ L) under light microscopy at 100 and 400x magnification. Brome-phenol blue-stained smears [15] were prepared with 5 μ L of semen for evaluating the sperm viability and morphology, and acrosome integrity using light microscopy (1000 $\times$), counting 200 cells per slide. The morphologic defects detected in the sperm were classified as primary or secondary. Following the initial assessment, a 5 μ L semen aliquot was diluted in 10% buffered formalin (1 mL) and the sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber. The functional integrity of the sperm membrane was evaluated by a hypo-osmotic swelling (HOST) test, using distilled water (0 mOsm/L) as the hypo-osmotic solution [16]. An aliquot (0.01 mL) of semen was diluted in 0.09 mL hypo-osmotic solution and kept in a water bath at 38 °C. After 45 min, an aliquot of semen was placed on a glass slide, covered by a coverslip, and evaluated by phase-contrast microscopy (400x), counting 200 cells. Sperm with swollen coiled tails were considered to have a functional membrane.

2.5. Extenders and freezing–thawing procedures

A Tris-based extender was used as a control group. This extender was comprised of 3.028 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78 g monohydrated citric acid, and

1.25 g D-fructose dissolved in 100 mL ultrapure water [3]. The extender osmolarity was 295 mOsm/L and the pH was 6.6. Further, 10% egg yolk was added to this extender.

The ACP[®] used in the experiment was registered as ACP-116c[®] for use in the cryopreservation of the collared peccary semen. ACP-116c[®] is composed of dehydrated coconut water and pH regulators. A vial of ACP-116c[®] contains 12 g of the product, which must be diluted with 50 mL of distilled water according to fabricant recommendation (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Brazil). After reconstitution, the extender pH was 7.4 with an osmolarity of 307 mOsm/kg. This extender was tested with the addition of 10% (group ACP10) and 20% (group ACP20) egg yolk.

The semen samples were divided into three aliquots immediately after collection and initial evaluation. After dilution in Tris, ACP10 or ACP 20, all samples were stored in a water jacket (30 mL) at 27 °C and equilibrated for 240 min to reach 5 °C in a refrigerator. Subsequent to cooling, the control sample was added to Tris plus 6% glycerol (also at 5 °C), which resulted in a final concentration of 3% glycerol in the extender. The test samples were divided in other two aliquots and to both were added 3 and 6% glycerol, which resulted in a final concentration of 1.5 and 3% glycerol. After second dilution, there were four groups: ACP10-1.5, ACP10-3, ACP20-1.5, and ACP20-3. For all samples, the final dilution resulted in a sperm concentration of 100×10^6 sperm/mL. The sperm motility and vigor were evaluated immediately after the addition of glycerol. The samples were packed into 0.25 mL plastic straws and placed horizontally in an insulated box for 20 min, at 3 cm above the liquid nitrogen (N₂) level. Finally, the straws were plunged into liquid N₂ for storage. After 1 month, the samples were thawed by immersing the straws in a water bath at 37 °C per min. The semen was immediately evaluated, as reported for fresh semen. In addition, sperm plasma membrane integrity was assessed by fluorescent probes as it will be described further.

2.6. Evaluation of post-thaw sperm plasma membrane integrity

Plasma membrane integrity was assessed with a fluorescent solution containing fluorophores 6-carboxy- fluorescein diacetate (C-FDA) and propidium iodide (PI). Initially, fresh ejaculates were used for standardizing the protocols for the evaluation of collared peccary sperm. One aliquot of 10 μ L thawed semen was extended in 40 μ L fluorescent solution. After ten minutes, slides of the stained samples were evaluated by epifluorescence microscopy (LEICA – Episcopic Fluorescent Attachment “EFA” Halogen Lamp Set, Sweden). For each sample stained with CFDA/ PI, 200 sperm cells were counted and classified as having or not having an intact plasmalemma based on the color. The cell membranes stained in green (CFDA) were considered intact, while those stained in red (PI) or partially stained were considered as non- intact [17].

2.7. Statistical analysis

A total of 12 replicates were performed for each treatment. The results were expressed as mean and standard error. Data were checked for normality by the Shapiro–Wilk test, and for homoscedasticity by Levene’s test using the Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, USA). The values expressed in percentages were Arcsine transformed. Comparisons among different extenders on the seminal parameters were made by the variance analysis followed by the student’s t test. The effect of the extenders on sperm vigor was evaluated by the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *Fresh and extended semen*

A total of 20 attempts for semen collection were conducted in 9 animals, out of which successful ejaculation was achieved only in 7 animals, from which 17 ejaculates were obtained (17 of 20 – 90% success in collecting an ejaculate). From those ejaculates only twelve were used; the other five ejaculates were not used in the experiment owing to low volume, motility, or vigor. Regarding the ejaculates included in the experiment, two ejaculates were collected from each of the 3 animals, three other males ejaculated only in one occasion, and three samples were collected from one male. The twelve ejaculates used were white and watery, with an average volume of 2.8 ± 0.7 mL. The other semen characteristics are expressed in Table 1.

It was observed that in any group, addition of the extenders provoked no decline in the sperm motility and vigor ($P > 0.05$). Otherwise, glycerol addition significantly ($P < 0.05$) reduced the sperm motility and vigor in all the samples (Table 2).

3.2. *Post-thaw sperm characteristics*

The freezing and thawing procedures induced a decrease in the sperm characteristics when fresh semen was taken as reference (Table 3). Regarding the comparison among groups, it was verified that ACP-116c[®] plus 20% egg yolk and 3% glycerol provided better results for sperm motility and vigor after thawing than Tris extender ($P < 0.05$). However, no differences were verified among treatments with regard to the other sperm characteristics ($P > 0.05$).

4. Discussion

The concept of *ex situ* genetic management of small captive populations of endangered species, such as the collared peccary, with a view to re-introduce them into the wild, is attracting increasing interest [18]. Further, the development in biotechnology of sperm cryopreservation offers an opportunity to maximize the reproductive potential of this species, thus contributing both to its preservation as well as to the development of strategies for its production in captivity breeding programs. This second goal is especially interesting since collared peccaries are important as well for the economy of Latin American populations owing to the trade of the meat and pelts that are well-accepted in the international market [1].

In the present research, it was observed that all the samples suffered a reduction in semen parameters after thawing regardless of the extender. In fact, it is known that the sperm undergo successive and opposite changes in cell volume by osmotic changes caused during glycerol addition, freezing, and thawing [19]. Moreover, the fluidity and functional properties of the sperm membranes are modified for the temperature decreases during the cooling and freezing phases, as well as during thawing [20]. This results in a reduction of their selective permeability, which ultimately leads to a major influx of calcium [21]. The plasma membrane is the primary site of injury for cryopreserved sperm and the main damage occurs during freezing and thawing [22], resulting in a substantial loss of viability.

The results obtained with Tris-based extender after thawing were similar to those previously reported in the literature [3,4]. However, it was demonstrated that ACP-

116c[®] could be efficiently used as an alternative for semen freezing in collared peccaries. Also, the use of ACP-116c[®] plus 20% egg yolk and 3% glycerol promoted a significantly better preservation of the sperm motility and vigor when compared to Tris. The biochemical characteristics of the ACP[®] are very similar to those of fresh coconut water. In addition to its rich composition [6], coconut water is also comprised of arginine, lysine, and high concentrations of Na⁺ and K⁺ which are important factors for the reversible suppression of sperm motility and longevity in the honey bee [23]. Furthermore, it was previously demonstrated that indole-3-acetic acid (IAA), a vegetal hormone present in coconut water, could enhance the conservation of sperm of swine [24], which is a domestic species more closely related to the collared peccary [25].

It should be mentioned that no significant differences were evidenced among groups formed by ACP-116c[®]; however, higher numerical results for sperm motility and vigor were obtained when 20% egg yolk plus 3% glycerol were used, which were also significant different from the Tris-based extender. These results are similar to those reported for domestic swine in which the extenders used for the sperm cryopreservation are usually added by 20% egg yolk [26,27]. No differences were evidenced among treatments with regard to other sperm characteristics. It is reported that high egg yolk concentrations do not interfere with the results of sperm vitality and morphology [28].

Since glycerol is the main cryoprotectant used for freezing the semen obtained from various species, concentrations below 2% or above 6% are reported to be deleterious owing to the low cryoprotectant activity or the toxicity to the sperm, respectively [29]. In the present study, no differences were evidenced for ACP-116c[®] when 1.5 or 3% glycerol concentrations were used for collared peccary semen. Similar results were reported for domestic swine wherein the general view is that relatively low concentrations of glycerol (1 to 3%) are required for maximum post-thaw survival. This

is stated owing to the belief that the primary cryoprotective effect of glycerol on swine sperm might be extracellular [30].

It is proposed that glycerol, as well as other penetrating cryoprotectants, are osmotically active that change the water content and cause stress while entering or exiting the cell [31]. In the specific case of pig sperm, these cells use glycerol as a carbon source, even in the presence of other substrates such as glucose [32]. Beside, extenders with glycerol addition to the egg yolk have a synergic effect, increasing the post-thaw survival of sperm cells [33]. The greater sperm survival of the samples frozen in extenders can thus be attributed to a reduction in the osmotic stress, owing to the combination of cryoprotectants used in the extender.

In general, the use of additives improves the quality of preserved sperm. It is speculated that the benefit of this association might be attributed to the different nature of the molecules involved in their effect. Egg yolk addition improves the sperm viability during storage [34]. Glycerol inclusion to extenders with egg yolk has shown a synergistic protective effect during cooling and freezing [35]. The cryoprotectant concentrations for the freezing of semen should be chosen such that the osmotic tolerance limits of the cells are not exceeded. Both the loss in cell viability due to exposure to cryoprotectants as well as cell survival after freeze–thaw and return to isosmotic conditions should be taken into consideration while designing cryopreservation protocols [36].

The present research involves an attempt to improve the semen freezing protocols thereby aiming at the formation of a germplasm bank for collared peccaries. It was demonstrated that a coconut water-based extender, ACP-116c[®], could be efficiently used for the cryopreservation of semen of this species. The addition of 20% egg yolk

and 3% glycerol to this extender is recommended in order to achieve better results for the semen preservation.

Acknowledgements

The authors thank Brazilian Council of Scientific Development – CNPq and Research Program in Biodiversity – PPBio for grants and for financial support, and CEMAS/UFERSA for providing the animals used in the experiment.

References

- [1] Bodmer RE, Aquino R, Puertas P, Reyes C, Fang T, Gottdenker N. Manejo y Uso Sustentable de Pecaríes en la Amazonía Peruana. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission No. 18. 1997. IUCN-Sur, Quito, Ecuador.
- [2] ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade: Six species of ungulate mammals are threatened for extinction in Brazil. Available at <http://www.icmbio.org.br>. 2011.
- [3] Castelo TS, Bezerra FSB, Souza ALP, Moreira MAP, Paula VV, Oliveira MF, Silva AR. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. *Theriogenology* 2010;74:1060-1065.
- [4] Castelo TS, Bezerra FSB, Lima GL, Alves HM, Oliveira IRS, Santos EAA, Peixoto GCX, Silva AR. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Cryobiology* 2010;61:275–279.

- [5] Cardoso, RCS, Silva, AR, Silva, LDM. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod* 2005;2:257-262.
- [6] Blume H, Marques Jr AP. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos [Evaluation of coconut water for the culture and cryopreservation of murid embryos]. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1994;18(3-4):97-104.
- [7] Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM, Chirinéa VH, Souza FF, Lopes MD. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod Dom Anim* 2007;42: 11–16.
- [8] Viveiros ATM, Maria AN, Orfão LH, Carvalho MAM, Nunes JF. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: *International Symposium on Reproductive Physiology of Fish 2007*. Saint Malo: France: 232 [abstract].
- [9] Toniolli R, Toniollo GH, Franceschini PH, Morato FMAC. Use of powder coconut water as extender (ACP-103®) for boar semen longer preservation: in vitro and in vivo evaluations. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2010;62:1072-1079.
- [10] Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology* 2011;76:1084–1089
- [11] England GCW. Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert* 1993;47:243-255.
- [12] Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990;11:73-88.

- [13] Farstad W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* 1996;42:251-260.
- [14] Souza ALP, Castelo TS, Queiroz JPAF, Barros IO, Paula VV, Oliveira MF, Silva AR. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. *Anim Reprod Sci* 2009;116:370–375.
- [15] Derivaux, J. Reprodução dos animais domésticos. Zaragoza: Ed. Acribia, 1980;446.
- [16] Moussa M, Mertinet V, Trimeche A, Tainturier M, Anton M. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002;57:1695-1706.
- [17] Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM, Chirinea VH, Lopes MD, Souza FF. Prognostic value of canine frozenthawed semen parameters on in vitro sperm oocyte interactions. *Theriogenology* 2006;66:456–62.
- [18] Bainbridge DR, Jabbour HN. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. *Vet Rec* 1998;143:159–168.
- [19] Mann T. Biochemistry of semen. In: Greep RO, Astwood EB (ed): *Handbook of Physiology*. Washington DC, American Physiology Society, 1975;5:321–47.
- [20] Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:3–22.
- [21] Maxwell WM, Johnson LA. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 1997;46:408–18.
- [22] Bailey JL, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation in farm species: an update. *Can J Anim Sci* 2003;83:393–401.

- [23] Almeida R, Soares AEE. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; Himenoptera:Apoidea). *Interciencia* 2002;27:317–21.
- [24] Toniolli R, Bussi re J, Courot M, Magistrini M, Combarnous Y. Effect of indole-3-acetic (plant auxin) on the preservation at 15 C of boar semen for artificial insemination. *Reprod Nutr Dev* 1996;36:503–11.
- [25] Cavalcante-Filho M F, Miglino MA, Machado GV, Bevilacqua EMAF, Neves WC. Comparative study of the morphology of the stomach of White lipped peccary (*Tayassu pecari*) and of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Braz J Morph Sci* 1998;15:206–207.
- [26] Garcia JC, Dominguez JC, Pena FJ, Alegre B, Gonzalez R, Castro MJ, Habing GG, Kirkwood RN. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science* 2010;119:160–165.
- [27] Spencer KW, Purdy PH, Blackburn DH, Spiller SF, Stewart TS, Knox RV. Effect of number of motile, frozen-thawed boar sperm and number of fixed-time inseminations on fertility in estrous-synchronized gilts. *Animal Reproduction Science* 2010;121:259–266.
- [28] Wall RJ, Foote RH. Fertility of bull semen frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. *Journal Dairy Science* 1999;82:817–821.
- [29] Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 1986;23:1–13.
- [30] Paquignon, M. Freezing and thawing extenders of boar spermatozoa. In: L. A. Johnson and K. Larsson (Ed.) *Deep Freezing of Boar Semen*. Swedish Univ of Agric Sci, Uppsala, Sweden, 1985:129–146.

- [31] Bhur M, Fiser P, Bailey J, Curtis E. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl* 2001;22:961–969.
- [32] Óshe T, Dacheaux JL, Paquignon M. Metabolism of boar spermatozoa before, during preparation for, and after storage in liquid nitrogen. *J Reprod Fert* 1979;55:277–285.
- [33] Paz P, Alvarez-Rodriguez M, Nicolas M, Alvarez M, Chamorro MA, Borragán S, Martinez-Pastor F, Anel L. Optimization of glycerol concentration and freezing rate in the cryopreservation of ejaculate from brown bear (*Ursus arctos*). *Reprod Dom Anim* 2011; doi: 10.1111/j.14390531.2011.01808.x.
- [34] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:77–111.
- [35] Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine sperm during freezing. *J Anim Sci*. 1974;39:1144–1149.
- [36] Hoffmann N, Oldenhofa H, Morandinic C, Rohnb K, Siemea H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing. *Anim Reprod Sci* 2011;125: 112–118.

Table 1.

Sperm characteristics in fresh ejaculates of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) collected by electroejaculation. (N = 12 ejaculates).

	Mean $\pm$ SEM	Range
Volume (mL)	2.8 $\pm$ 0.7	0.6 – 7.5
Sperm concentration ($\times 10^6$)	765 $\pm$ 313.7	150 – 4130
Sperm motility (%)	86.7 $\pm$ 2.6	5.0 – 95
Vigor (0-5)	4.4 $\pm$ 0.3	3– 5
Sperm viability (%)	92.3 $\pm$ 1.6	83 – 100
Hyposmotic swelling test (%)	75. 3 $\pm$ 2.3	65.0 – 86
Sperm morphology		
Normal (%)	83.2 $\pm$ 2.2	67 – 92
Primary defects (%)	0.7 $\pm$ 0.4	0 – 3
Secondary defects (%)	16.7 $\pm$ 2.3	8 – 33
Total defects (%)	6.8 $\pm$ 2.2	8– 33
Acrossomal integrity (%)	100 $\pm$ 0	100 – 100

Table 2.

Mean $\pm$ SEM values for sperm motility and vigor in fresh, extended and glycerol-added semen (n=12) from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using extenders based in Tris (control group) and powdered coconut water (ACP-116c) plus different concentrations of egg yolk (EY) and glycerol (GLY).

Semen	Extender	Motility (%)	Vigor (0-5)
Fresh		86.7 $\pm$ 2.6 ^a	4.4 $\pm$ 0.3 ^a
Extended	Tris	75.4 $\pm$ 3.3 ^a	3.7 $\pm$ 0.2 ^a
	ACP plus 10% EY	77.5 $\pm$ 3 ^a	3.7 $\pm$ 0.1 ^a
	ACP plus 20% EY	79.2 $\pm$ 3.8 ^a	3.8 $\pm$ 0.2 ^a
Glycerol added	Tris	49.6 $\pm$ 6.5 ^b	2.5 $\pm$ 2.3 ^b
	ACP plus 10% EY and 1.5% GLY	61.7 $\pm$ 5.4 ^{bc}	2.9 $\pm$ 0.3 ^b
	ACP plus 10% EY and 3% GLY	54.2 $\pm$ 6 ^b	3.1 $\pm$ 0.2 ^b
	ACP plus 20% EY and 1.5% GLY	57.9 $\pm$ 6.6 ^b	3 $\pm$ 0.2 ^b
	ACP plus 10% EY and 3% GLY	57.5 $\pm$ 6.3 ^b	3.1 $\pm$ 0.3 ^b

^{a, b, c} Within a column, means without a common superscript differ (P < 0.05).

Table 3.

Characteristics of frozen-thawed sperm from collared peccaries (N=12), extended in Tris (control group) or powdered coconut water (ACP-116c[®]) plus different egg yolk (EY) and glycerol (GLY) concentrations.

	Tris	ACP plus 10% EY and 1.5% GLY	ACP plus 10% EY and 3% GLY	ACP plus 20% EY and 1.5% GLY	ACP plus 20% EY and 3% GLY
Sperm Motility (%)	30.4 ± 5.7 ^b	33.4 ± 5.5 ^{ab}	40.8 ± 6.9 ^{ab}	44.6 ± 6.2 ^{ab}	48.3 ± 6.1 ^a
Vigor (0-5)	2.4 ± 0.2 ^b	3.0 ± 0.2 ^a	2.9 ± 0.2 ^a	3.0 ± 0.2 ^a	2.8 ± 0.2 ^a
Sperm viability (%)	36.6 ± 5.6	42.7 ± 4.8	40.4 ± 5.3	41.7 ± 4	45.3 ± 4.8
Hyposmotic swelling test (%)	50 ± 5.8	50.3 ± 6.5	61.17 ± 5.62	57.5 ± 5.7	59.9 ± 5.0
Sperm membrane integrity (%)	34.1 ± 7.1	30 ± 6.8	33.3 ± 7.9	33.4 ± 6.5	25.8 ± 5.0
Sperm morphology					
Normal (%)	64.6 ± 5.4	63.4 ± 6.0	65.84 ± 5.3	57.5 ± 5.7	64.75 ± 5.6
Primary defects (%)	3.1 ± 1.1	0.9 ± 0.5	6.75 ± 3.93	2.34 ± 0.76	3.25 ± 0.9
Secondary defects (%)	33.2 ± 5.6	35.7 ± 6.0	27.34 ± 5.8	36.9 ± 6.9	32.0 ± 5.8
Total defects (%)	36.3 ± 5.3	36.6 ± 6.0	34.08 ± 5.3	30.6 ± 3.92	35.25 ± 5.6
Acrossomal integrity (%)	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	99.83 ± 0.16	100.0 ± 0.0

^{a,b} Within a row, means without a common superscript differ (P < 0.05).

