



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

**EFEITO DOS PROCESSOS DE CENTRIFUGAÇÃO,
DILUIÇÃO E DESCONGELAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

THIBÉRIO DE SOUZA CASTELO

Médico Veterinário

MOSSORÓ – RN – BRASIL

Março – 2010

THIBÉRIO DE SOUZA CASTELO

**EFEITO DOS PROCESSOS DE CENTRIFUGAÇÃO,
DILUIÇÃO E DESCONGELAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

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

Março – 2010

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

C348e Castelo, Thibério de Souza.

Efeito dos processos de centrifugação, diluição e descongelamento sobre a qualidade do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758). / Thibério de Souza Castelo. -- Mossoró: 2010.

100f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Área de concentração: Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

Orientador: Prof.^a Dr. Sc. Alexandre Rodrigues Silva

1.Semen de cateto. 2.Criopreservação. 3.Centrifugação. 4. Taxa de descongelamento. Título.

CDD:636.9734

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo

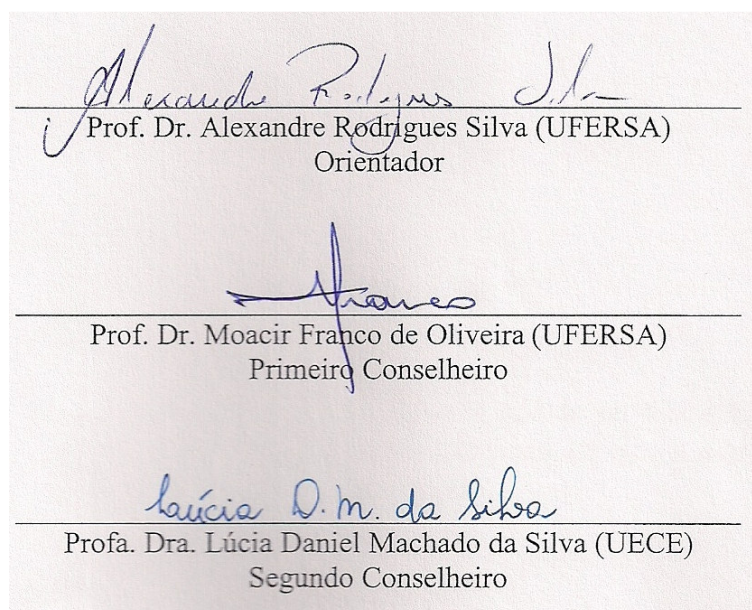
THIBÉRIO DE SOUZA CASTELO

**EFEITO DOS PROCESSOS DE CENTRIFUGAÇÃO,
DILUIÇÃO E DESCONGELAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**

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: 05/03/2010

BANCA EXAMINADORA:



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THIBÉRIO DE SOUZA CASTELO– Nascido no Município de Natal-RN no dia 11/04/1985, filho de Edmar Castelo da Silva Junior e Jane Rose de Souza Castelo, concluiu o ensino médio e fundamental no Colégio Marista de Natal. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2007.2, onde foi bolsista de PIBIC pelo período de um ano. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com tecnologia de sêmen nas diferentes espécies e com influência de ionóforos sobre a puberdade em fêmeas caprinas jovens. Em janeiro 2008 foi selecionado pelo Programa em Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA. Durante o período do mestrado, foi colaborador nas disciplinas de Reprodução Animal e Inseminação Artificial do curso de Zootecnia, Fisiopatologia da Reprodução e Ginecologia e Obstetrícia Veterinária do curso de medicina veterinária ambos na UFERSA.

À Deus o grande criador e a minha família que
sempre foi meu alicerce o que permitiu mais essa
conquista

Dedico

*Graças, Pai. Hoje venho te dar e prostrar-me aos Teus pés
somente para agradecer-Te, somente para dar-Te graças
pois não encontro outras palavras em meu ser
Graças, Pai. Sei que Te fiz chorar
por ser um mal-agradecido, por não haver Te obedecido
mesmo assim me tens amado, não me tens abandonado
permaneces ao meu lado, venho agradecer
Graças, Pai, por amar-me numa cruz, com amor incomparável
em Teu filho Jesus
Graças, Pai, por Teu amor e Tua bondade, por Tua força e amizade
por seu um Pai leal, sempre leal
Graças, Pai, pelos pequenos e belos detalhes
por cada coisa que me deste, por cada coisa que me negaste
mais que isto, graças, Pai, por Ti mesmo e pelo que És
por Ti mesmo e como És, venho agradecer
Graças, Pai, pelas dores e alegrias, por estar sempre ao meu lado
por Teu grande amor, meu Senhor
Graças, Pai... Graças, Pai...
Graças, graças, graçaS*

Pe Fábio de Melo

AGRADECIMENTOS

À Deus o arquiteto do universo, ele permitiu todas as minhas vitórias

Minha família, que sempre deu apoio em todas as decisões, eles são os responsáveis por todas as conquistas de minha vida. Tudo eu devo a eles.

Minha namorada que a partir do fim dessa etapa será noiva, que aguentou todos os meus estresses e mesmo assim sempre me entendeu e esteve ao meu lado. Obrigado por tudo meu amor.

A meus amigos que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. Em especial à meu grande amigo e irmão Silvestre. Esse sim estava comigo toda hora.

A todos os integrantes do LCGA, aos que passaram por lá e aos que ainda estão presente. Eles ajudaram bastante na execução dos trabalhos e compartilharam os melhores e piores momentos.

Ao professor Alexandre que apesar do título de mestre ser meu ele é o grande mestre, pois além de ensinamentos cinetífico, ele nos prepara para vida. Sempre será um exemplo de profissional e pessoa para mim.

Aos membros da banca pela grande colaboração no aperfeiçoamento do trabalho.

EFEITO DOS PROCESSOS DE CENTRIFUGAÇÃO, DILUIÇÃO E DESCONGELAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN DE CATETOS (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)

CASTELO, T. S. **Efeito dos processos de centrifugação, diluição e descongelamento sobre a qualidade do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2010.

RESUMO – Avaliou-se o efeito da centrifugação e da utilização de diluentes a base Tris suplementados com diferentes açúcares além de diferentes taxas de descongelamento sobre os padrões cinemáticos de motilidade e outras características do sêmen congelado-descongelado de catetos em cativeiro. O sêmen de 13 catetos foi coletado por eletroejaculação e avaliados subjetivamente e através de análise computadorizada (CASA) para motilidade, vigor. Outras características como viabilidade espermática, integridade da membrana e morfologia dos espermatozoides também foram avaliadas. O sêmen foi dividido em quatro alíquotas: duas foram submetidas à centrifugação e em seguida diluídas, uma em tris acrescido de frutose e a outra em tris acrescido de glicose, as outras duas forma imediatamente diluídas da mesma forma. Gema de ovo (20%) e glicerol (6%) foram adicionados para todos os grupos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas usando duas taxas de descongelamento (37°C/1min e 55°C/7s). Os resultados demonstraram uma redução na motilidade total imediatamente após a diluição em ambos diluentes para as amostras centrifugadas, bem como em alguns parâmetros cinemáticos como BCF, LIN e STR além do aumento no número de alterações morfológicas totais e secundárias independente do açúcar utilizado ($P < 0,05$), tendo em vista não ter apresentado diferenças entre os diluentes suplementados com frutose ou glicose em nenhum momento ($P > 0,05$). Além disso, nenhuma interação entre a suplementação de açúcar e as taxas de descongelamento foi observada para qualquer parâmetro seminal avaliado ($P > 0,05$). Em conclusão, não é necessário centrifugar o ejaculado de catetos antes dos procedimentos de congelamento e descongelamento, para os quais pode-se utilizar um diluente a base de Tris suplementado tanto com frutose ou glicose, bem como utilizando taxas de descongelamento diferentes (37°C/1min e 55°C/7s).

Palavras-Chave: sêmen cateto (*Tayassu tajacu*), criopreservação, centrifugação, diluentes, açúcares, taxa de descongelamento

EFFECT OF THE PROCEDURES FOR CENTRIFUGATION, DILUTION AND CRYOPRESERVATION ON THE QUALITY OF THE SEMEN OF COLLARED PECCARY (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)

CASTELO, T.S. **Effect of the procedures for centrifugation, dilution and thawing on the quality of the semen of collared peccary (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758).** 2010. 100p. Thesis (Master's degree In Animal Science: Animal Production and Reproduction) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2010.

ABSTRACT: We evaluated the effect of centrifugation and the use of Tris-based extender supplemented with different sugars as well as different rates of thawing on the kinematic pattern of motility and other characteristics of frozen-thawed semen from captive collared peccaries. Semen from 13 collared were collected by electroejaculation and evaluated subjectively for motility, vigor and by computer analysis (CASA). Other features such as sperm viability, membrane integrity and morphology of spermatozoa were also evaluated. Semen was divided into four portions: two were subjected to centrifugation and then diluted in a tris plus fructose and the other in tris supplemented with glucose, the other two forms were immediately diluted in the same way. Egg yolk (20%) and glycerol (6%) were added to all groups. The samples were frozen in liquid nitrogen and thawed using two thawing rates (37°C/1min and 55°C/7s). The results showed a reduction in total motility immediately after the dilution using both extenders and interference in some kinematic parameters such as BCF, LIN and STR for the samples centrifuged, , in addition, an increase in the number of total and secondary morphological defects were observed in centrifuged samples, independent to the sugar used ($P < 0.05$). No significant differences among the extenders supplemented with fructose or glucose were verified at any time ($P > 0.05$). Furthermore, no interaction between the supplementation of sugar and thawing rates were observed for any semen parameter evaluated ($P > 0.05$). In conclusion, it is not necessary to centrifuge the semen from collared prior to the procedure of freezing and thawing, which can be achieved through a Tris-based extender supplemented with either fructose or glucose, as well as using different thawing rates (37°C/1min and 55°C/7s).

Keywords: semen, collared peccary (*Tayassu tajacu*), cryopreservation, centrifugation, extenders, sugars, thawing rate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
ACP	Água de coco em pó
ALH	Amplitude lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento cruzado
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> – Análise de Sêmen Computadorizada
cm	Centrímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
DMF	Dimetilformamida
E.P.	Erro Padrão
g	Grama
GLM	<i>General Linear Model</i> – modelo liner geral
HOST	Teste hipo-osmótico
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
kg	Quilogramas
km ²	Quilometro quadrado
L	Litro
LIN	Linearidade
m	Metro
mg	Miligrama
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
mol	Moleculagrama
mOsm	Miliosmóis
MHz	MegaHertz
n	Amostra
NAR	<i>Normal acrosome ridge</i> – Crista Acrossomal Normal
NC	<i>New California</i>
N ₂	Nitrogênio líquido
P	Probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundos
SAS	<i>Statistical Analysis System</i> – Sistema de Análise Estatística
SCA	<i>Sperm Class Analyzer</i>
STR	Retilinearidade
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido
UI	Unidades internacionais
USA	Estados Unidos da América
VAP	Velocidade média da trajetória

VCL	Velocidade curvilínea
vs.	Versus
VSL	Velocidade linear progressiva
μL	Microlitros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características do sêmen fresco de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) coletado por eletroejaculação (n=12 ejaculates).....	53
Tabela 2: Média $\pm$ E.P da motilidade e vigor do sêmen de cateto (<i>Tayassu tajacu</i>), fresco, diluído e adicionado de glicerol usando diluente Tris suplementado com frutose ou glicose (n=12).....	54
Tabela 3: Média $\pm$ E.P do sêmen fresco e congelado (n=12) de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>) usando diluente Tris suplementado com frutose ou glicose e diferentes taxas de descongelação.....	55
Tabela 4: Média $\pm$ E.P dos valores de motilidade e vigor antes e após a adição do crioprotetor (CRIOP) a (5° C) nas amostras diluídas com Tris glicose (GLI) e Tris frutose (FRUT), submetidas ou não ao processo de centrifugação (CC; SC).....	69
Tabela 5: Valores de média $\pm$ E.P das avaliações seminais realizadas imediatamente após a descongelação para o sêmen de cateto submetido à centrifugação (CC) ou não (SC), congelados com Tris glicose (GLI) e Tris frutose (FRUT).....	70
Tabela 6: Valores de média $\pm$ E.P dos parâmetros de motilidade realizado por análise computadorizada no sêmen de catetos submetido a diferentes tratamentos.....	71
Tabela 7: Média $\pm$ E.P das Subpopulações espermáticas no sêmen congelado-descongelado de catetos para os diferentes tratamentos.....	71

SUMÁRIO

	Página
1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1 SITUAÇÃO E DESAFIO.....	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.2.1 ASPECTOS GERAIS DO CATETO.....	18
1.2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CATETOS.....	19
1.2.3 AVALIAÇÃO SEMINAL.....	20
1.2.4 CENTRIFUGAÇÃO.....	22
1.2.5 DILUENTES.....	24
1.2.5.1 AÇÚCARES.....	25
1.2.6 CRIOPROTETOR.....	26
1.2.7 CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAÇÃO.....	29
1.2.8 OBJETIVOS.....	33
1.2.8.1 Geral.....	33
1.2.8.2 Específicos.....	33
1.2.9 REFERÊNCIAS.....	34
2 CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DE DILUENTES SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES AÇÚCARES E TAXA DE DESCONGELAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SEMEN DE CATETOS (TAYASSU TAJACU).....	47
2.1 RESUMO.....	47
2.2 INTRODUÇÃO.....	48
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.3.1 Animais.....	49
2.3.2 Anestesia.....	49
2.3.3 Coleta do sêmen.....	50
2.3.4 Avaliação Seminal.....	50
2.3.5 Diluentes.....	51
2.3.6 Processamento do sêmen.....	51
2.3.7 Processo de descongelação	52
2.3.8 Análise Estatística.....	52
2.4 RESULTADOS.....	53
2.4.1 Sêmen fresco e diluído.....	53
2.4.2 Características do sêmen descongelado.....	54
2.4.3 Característica do sêmen pós descongelação.....	54
2.5 DISCUSSÃO.....	55
2.6 CONCLUSÕES.....	57
2.7 REFERÊNCIAS.....	58
3 CAPÍTULO 3 – EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E DE DILUENTES A BASE DE TRIS SOBRE OS PADRÕES CINEMÁTICOS DE MOTILIDADE NO SÊMEN CONGELADO-DESCONGELADO DE CATETOS (Tauassu tajacu).....	62

3.1 RESUMO.....	62
3.2 INTRODUÇÃO.....	63
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.3.1 Animais experimentais.....	64
3.3.2 Anestesia.....	65
3.3.3 Coleta de sêmen.....	65
3.3.4 Avaliação seminal.....	65
3.3.5 Diluentes.....	66
3.3.6 Processo de centrifugação.....	67
3.3.7 Processamento de congelação e descongelação.....	67
3.3.8 Análise do sêmen assistida por computador.....	68
3.3.9 Análise estatística.....	68
3.4 RESULTADOS.....	69
3.4.1 Sêmen fresco e diluído.....	69
3.4.2 Características do sêmen após a descongelação.....	70
3.5 DISCUSSÃO.....	72
3.6 CONCLUSÕES.....	75
3.7 REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	80
ANEXO 01 - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “INFLUENCE OF THE EXTENDER SUPPLEMENTED BY DIFFERENT SUGARS AND THE THAWING RATE ON THE CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM COLLARED PECCARIES (<i>TAYASSU TAJACU</i>)” À REVISTA THERIOGENOLOGY.....	81
ANEXO 02 - INFLUENCE OF THE EXTENDER SUPPLEMENTED BY DIFFERENT SUGARS AND THE THAWING RATE ON THE CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM COLLARED PECCARIES (<i>TAYASSU TAJACU</i>).....	82
ANEXO 03 – DESCRIÇÃO DOS MODELOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS.....	99
A) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 3.....	99
B) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 4.....	99

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 SITUAÇÃO E DESAFIO

Os “porcos do mato” pertencem à ordem Artiodactyla, à sub-ordem Suiforme e à família Tayassuidae. São conhecidos popularmente como cateto, caititu, taititu, javalina, pecari, pecari-de-coleira ou porco-do-mato. 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 (CAVALCANTE-FILHO, 1996).

O cateto é um animal agressivo, pelo instinto de defesa, porém o desmatamento e a caça predatória tornaram-se ameaças concretas para espécie. Em alguns lugares, a população do animal já diminuiu drasticamente. Diante do quadro de ameaça do cateto, surge a preocupação da criação do animal em cativeiro com o intuito de diminuir a caça predatória e também fornecer uma fonte alternativa de proteína para população. A criação legalizada de animais silvestres vem ganhando cada vez mais força no Brasil (IBAMA, 1997). A criação do cateto é uma alternativa em termos da produção de uma carne com grande aceitação devido ao seu paladar suave e aos baixos níveis de colesterol (NOGUEIRA FILHO *et al.*, 1999). Esta criação permite, ainda, uma produção de peles de boa qualidade, com grande demanda no mercado internacional para a fabricação de artigos de luxo como calçados finos, luvas e casacos (DEUTSCH; PUGLIA, 1988; BODMER *et al.*, 1997). Além disso, pode promover a preservação e gerenciamento da biodiversidade local (ALBUQUERQUE, 2007). Ainda, a produção de catetos pode se tornar uma solução para o aproveitamento das áreas improdutivas de propriedades rurais, uma vez que se trata de uma espécie já adaptada às condições geográficas da região do semi-árido nordestino (NOGUEIRA FILHO *et al.*, 1999).

O sucesso dessa nova atividade econômica, no entanto, implica em um bom conhecimento da biologia da espécie em cativeiro, inclusive de seu comportamento e reprodução. Para a aplicação bem sucedida da reprodução assistida é necessário conhecimento prévio sobre a fisiologia reprodutiva da espécie de interesse, como as características normais do ejaculado. Além disso, o estudo da coleta, avaliação e preservação

do sêmen torna-se essencial a programas de reprodução no intuito de torná-lo mais eficiente (MORATO et al., 1998).

Intensa investigação é necessária para o desenvolvimento de métodos de preservação confiáveis em animais selvagens. Essa investigação precisa ter ênfase nas variações espécies específicas encontradas na fisiologia celular dos espermatozóides, bem como sobre as transformações específicas que gametas sofrem durante a refrigeração, congelamento e descongelamento (FICKEL et al., 2007). No entanto, os protocolos de congelamento de espermatozóides envolvendo o uso de diluentes, a escolha dos açúcares, processo de refrigeração e aquecimento têm como seu principal objetivo manter a motilidade espermática e viabilidade normal, através da prevenção da formação de cristais de gelo intracelular letal reduzindo danos ao acrossoma e a membrana plasmática durante a criopreservação (HU et al., 2009).

Outro ponto que pode influenciar a qualidade seminal após a criopreservação é o processo de centrifugação onde já foi descrito efeitos diferentes em diferentes espécies, ou seja, existe bastante controvérsia. Ainda, o sêmen criopreservado apresenta uma redução significativa da viabilidade após a descongelamento, procedimento este que pode provocar danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozóides (SALAMON; MAXWELL, 1995). Portanto, vários estudos têm sido conduzidos a fim de determinar a taxa ideal para a descongelamento do sêmen de diferentes animais, como varrão (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000), carneiro (PAULENZ et al., 2004) e cães (NÖTHLING; SHUTTLEWORTH, 2005).

Desta forma, sendo o cateto uma espécie silvestre onde pouco se sabe sobre a fisiologia do seu sêmen, faz-se necessário estudos sobre os açúcares adicionados ao diluente na criopreservação, bem como a influência do processo de centrifugação e a taxa de descongelamento ideal a fim de obter uma melhor recuperação de espermatozóides viáveis após a congelamento e descongelamento.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 ASPECTOS GERAIS DOS CATETOS

São semelhantes ao porco doméstico e ao javali (BODMER et al, 1997; COSTA et al, 2005). Porém, esta espécie se separou da família *Suidae* há dezenas de milhões de anos (BENIRSHCHKE, 1974). Portanto, apesar de serem semelhantes aos suínos domésticos e ao javali, os catetos não são porcos, diferindo dos mesmos em alguns aspectos, como por exemplo, presença de pré-estômagos (CAVALCANTE FILHO, 1996), vesícula biliar ausente, membros pélvicos contendo três dígitos e pela presença de uma glândula de cheiro na região dorsal próxima à cauda, cuja secreção tem odor forte e coloração esbranquiçada (SOWLS, 1984), tendo, certamente, um grande papel no reconhecimento individual e movimento do bando, porquê freqüentemente esfregam o focinho nas glândulas de seus congêneres (WALLACH; BOEVER, 1983).

Eles possuem orelhas e olhos pequenos, nariz em forma de tromba, cauda muito curta, corpo coberto por pêlos grosseiros, membros proporcionalmente delgados, em contraste com o corpo robusto, e dentes caninos superiores relativamente pequenos, pontudos cortantes e dirigidos para baixo (ORR, 1986). Entre a visão, o olfato e a audição, a visão é o sentido menos desenvolvido no cateto. O olfato é o mais desenvolvido e é usado para encontrar raízes e bulbos a uma profundidade superior a 0,5 m (SIMPSON, 1984).

Os catetos podem ser encontrados do Arizona, nos Estados Unidos, à Argentina, podendo utilizar variados habitats, incluindo florestas úmidas, xerófilas e desertos (MAYER ; WETZEL, 1987; EISENBERG ; REDFORD, 1999). Os grupos destas espécies podem variar de 5 a 50 indivíduos (CASTELLANOS, 1983; 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, bem como em cativeiro, nas regiões tropicais, estes animais tem uma atividade predominantemente diurna (CASTELLANOS, 1983; TABER et al., 1993; JUDAS; HENRY, 1999). Os indivíduos desta espécie são, em sua maioria, herbívoros e alimentam-se basicamente de fruta dos cactos, raízes, tubérculos, fungos e folhas, mas

ocasionalmente comem serpentes e outros pequenos vertebrados (NOWAK; PARADISO, 1983).

1.2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CATETOS

Apesar de pertencerem a uma família separada daquela à qual pertencem os suínos domésticos (*Sus scrofa*), devido a similaridades gerais com esta espécie, muitas informações a respeito do comportamento e fisiologia reprodutivos destes últimos têm sido extrapoladas aos catetos (WISLOCKI; DEMPESEY, 1931; MAYOR et al., 2006).

Do ponto de vista anatômico, os catetos possuem a bolsa escrotal localizada entre a região inguinal e perineal, a qual apresenta alguns pêlos finos e curtos. Os testículos apresentam média de 2,8 cm de largura, 2,6 cm de espessura, 5,4 cm de comprimento e 22,5 cm³ de volume, sendo ambos os testículos simétricos. A maturidade sexual nos machos é atingida aos 11 meses e a das fêmeas entre 8 e 14 meses. Durante a cópula, o cortejamento é iniciado pela fêmea. (BELLATONI, 1991).

Com relação aos aspectos reprodutivos dos machos dessa espécie, de acordo com Costa et al., (2009) o cateto apresenta peso testicular médio de $23,7 \pm 1,8$ g e as células de Leyding ocupam $12,8 \pm 1,8\%$ do parênquima testicular. O 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. A produção diária de espermatozoides por grama de testículo em catetos é de aproximadamente $23,4 \pm 2 \times 10^6$, que é semelhante à de suínos domésticos e selvagens (COSTA et al., 2009).

A eletroejaculação é considerada o método de eleição para obtenção de sêmen, especialmente para animais silvestres, já que permite o manuseio do animal vivo (MORAIS et al., 2002). É utilizada não só para avaliação andrológica, mas principalmente para obtenção de sêmen para estudos de conservação e inseminação artificial em animais silvestres, eliminando o contato físico necessário no momento da cópula ou coleta por vagina artificial e reduzindo risco da equipe executora do procedimento e de transmissão de doenças (PLATZ; SEAGER, 1978; TEBET et al., 2006).

Em catetos, já foram realizadas com sucesso coletas de sêmen por eletroejaculação usando-se diferentes protocolos anestésicos como a associação da tiletamina-zolazepam

(COSTA; PAULA, 2005) e o uso do anestésico propofol, tendo este apresentado maior eficiência para obtenção de espermatozóides viáveis que o protocolo citado anteriormente. No protocolo de maior sucesso, as coletas foram conduzidas utilizando-se um eletroejaculador (Eletrojet®, Eletrovet, São Paulo, Brasil), conectado a uma fonte de 12 V, utilizando um protocolo de estimulação contínua crescente, iniciando-se com 20 V, seguidos de um acréscimo de 10 V, até que fossem atingidos 120 V, quando os estímulos eram mantidos até serem completados cinco minutos desde o início do procedimento (SOUSA et al., 2009).

De acordo com Hellgren et al.(1989), foram identificadas três frações existentes no ejaculado de catetos. A primeira fração é límpida, a segunda considerada rica em espermatozóides e a terceira e última é a fração gel. Estudos mostram a presença da fração gel em uma pequena parte dos ejaculados obtidos por eletroejaculação. Assim, Costa e Paula (2005) sugerem que pelo processo de eletroejaculação pode existir ejaculação incompleta em catetos. Isso pode ser confirmado tendo em vista que durante a cópula natural são eliminados grandes volumes de sêmen (45 a 80 mL), este associado à grande quantidade da fração gel.

No tocante à morfometria espermática do cateto, este apresentou cabeça com 6 µm de comprimento, 4 µm de largura, peça intermediária e cauda medindo $11,17 \pm 1,7$ µm e $26,56 \pm 1,99$ µm de comprimento, respectivamente (SOUSA, 2008).

De acordo com Sousa et al. (2009), o ejaculado desta espécie obtido por eletroejaculação apresenta volume médio de 2,8 mL, com concentração de $67,7 \times 10^6$ espermatozoides /mL, possui motilidade de 75,4% com 81,1% de espermatozoides vivos, 81% de células morfollogicamente normais e 77% de acrossoma íntegros.

1.2.3 AVALIAÇÃO SEMINAL

Uma vez coletado o sêmen, o mesmo deve ter sua qualidade avaliada com base em parâmetros macroscópicos, como aparência e volume, e parâmetros microscópicos como motilidade, concentração, morfologia e viabilidade espermática entre outros (ZAMBELLI ; CUNTO, 2006). 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 avaliação da motilidade deve ser realizada imediatamente após a coleta ou descongelamento do sêmen através da microscopia óptica. Posteriormente, deve-se avaliar o

status de motilidade ou vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides móveis (SEAGER; FLETCHER, 1972) esse parâmetro é expresso em uma escala que vai de 0 a 5, cujas classificações são subjetivas variando conforme o autor.

Juntamente como as avaliações citadas anteriormente também deve ser realizada a avaliação da funcionalidade da membrana chamado de teste hiposmótico (HOST). Este teste baseia-se na observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelular. Com o influxo da água para o interior da célula, há uma edemaciação celular, com posterior dobramento da cauda (BITTENCOURT et al., 2005). O HOST tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: equinos (ALVES et al., 2004), caninos (DOBRANIĆ et al., 2005), ruminantes (SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2006; REVELL ; MRODE, 1994) e suínos (PEREZ-LLANO et al., 2001).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozóides utilizam-se esfregaços corados ou preparações úmidas, em microscópio de contraste de fase ou óptico sob óleo de imersão (aumento de 1000 x) onde as primeiras 200 células observadas são classificadas quanto aos defeitos de forma e estrutura (NEVES et al., 2008; SALVIANO; SOUZA, 2008). A partir das anormalidades espermáticas, tenta-se relacionar patologia espermática e fertilidade (SALVIANO; SOUZA, 2008). Blom (1950) procurou dar uma interpretação dinâmica ao estudo da morfologia espermática, dividindo as normalidades em duas classes: anormalidades primárias (verificadas durante o processo espermatogênico, são intragonadais) e secundárias (afetam o espermatozóide depois de formado, também consideradas extragonadais).

A concentração espermática representa o número de espermatozóides por milímetro cúbico (mm³) ou centímetro cúbico (cm³ = mL). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células através de microscopia óptica no hemocítômetro, ou como é mais conhecida: câmara de Neubauer, utilizando-se uma parte de sêmen para 400 de solução formol-salina tamponada, embora também se possa utilizar a espectrofotometria ou o *micro-cell-counter* (NEVES et al., 2008; SALVIANO; SOUZA, 2008).

A viabilidade espermática está relacionada com a integridade da membrana plasmática, que pode ser avaliada por meio de colorações vitais (EVANS; MAXWELL, 1990;

CHEMINEAU et al., 1991). Dentre os corantes mais utilizados, podem ser citados a eosina-nigrosina (EVANS; MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991; BEARDEN; FUQUAY, 1992), azul de tripan (BEARDEN; FUQUAY, 1992) e azul de bromofenol (MEDEIROS, 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Em várias espécies ainda, podemos citar outros testes para avaliação seminal como, o teste de termorresistência (STRÖM et al., 1997), o teste de capacitação e reação acrossômica *in vitro* (HEWITT et al., 2001), a análise ultra estrutural (RODRIGUES -MARTINEZ *et al.*, 1993) e os testes de incubação com oócitos homólogos ou heterólogos (MAYENCO-AGUIRRE ; PEREZ-CORTÉZ, 1998; METCALF, 1999; MASTROMONACO et al., 2002).

1.2.4 CENTRIFUGAÇÃO

Muitos estudos têm sido publicados, onde várias etapas do processo de criopreservação foram avaliadas, tais como taxas de resfriamento e aquecimento, choque térmico e o tempo de espera durante o resfriamento, os crioprotetores e sua concentração, além das formas de envase (BWANGA, 1990; HOLT, 2000; JOHNSON et al, 2000; WATSON, 2000). No entanto, muito pouca atenção tem sido dada à etapa de centrifugação, que os espermatozóides são submetidos antes de serem congelados.

Em suínos, a centrifugação é um passo necessário para ser realizada antes da congelação. A centrifugação facilita a remoção do plasma seminal, além de concentrar a população de espermatozóides para que eles possam ser rediluídos com diluidores de congelação. Pesquisas mostram que na criopreservação de sêmen suíno, são realizados uma variedade de protocolos de centrifugação onde os mais utilizados foram: 300 g por 10 minutos (PURSEL ; JOHNSON, 1975), 800 g por 10 minutos (WESTENDORF et al, 1975), 800 g por 15 minutos (PAQUIGNON ; COUROT, 1976), e 1400 g por 5 minutos (LARSSON et al, 1977). Sendo os dois primeiros a base para protocolos de criopreservação de sêmen suíno atualmente em vigor para uso comercial.

A centrifugação é uma das técnicas de preparação espermática mais comum para programas experimentais e práticos. A criopreservação de espermatozóides suínos com os métodos atuais traz prejuízos visto que reduz muito a quantidade de espermatozóides viáveis, geralmente mais de 50% não sobrevivem ao processo de congelação-descongelação

(ALMLID ; HOFMO, 1996). Esta diminuição é devida as alterações da temperatura e da manipulação de espermatozóides, que ocorre durante a centrifugação. A chave para esta questão é que a centrifugação causa dois problemas: 1) a perda de espermatozóides devido a remoção do sobrenadante (KATKOV ; MAZUR, 1998), e 2) os danos físicos causados à população de espermatozóides (ALVAREZ et al, 1993).

O resfriamento, armazenamento e transporte de sêmen destinado à inseminação é muito importante no manejo reprodutivo de diversas espécies. Vários autores relatam que a sobrevivência de espermatozóides e a motilidade do espermatozóide refrigerado aumentam com a remoção do plasma seminal, e um número de proteínas do plasma seminal foram identificadas como uma das causas da sobrevivência reduzida e perda da motilidade no sêmen suíno (STRZEZEK et al., 1992), bovino (WISHWANATH et al., 1992) caprino (PELLICER-RUBIO; COMBARNOUS, 1998), e equino (CARVER; BALL, 2002). Estas proteínas fazem contato com os espermatozóides durante a ejaculação, interagem com a membrana dos espermatozóides e influenciam em diferentes características, incluindo a motilidade (BRAUN et al., 1994). Os efeitos nocivos do plasma seminal sobre os espermatozóides durante o armazenamento a frio podem também estar relacionados com a ação de várias enzimas (CARVER; BALL, 2002). Em equinos, estes efeitos indesejáveis podem ser reduzidos pela diluição do sêmen ou pela remoção total ou parcial do plasma seminal (PICKETT et al., 1975). Serres et al. (2002) observaram em jumentos que a motilidade total, motilidade progressiva e HOST apresentaram resultados mais elevados para sêmen centrifugado que para o sêmen não centrifugado.

Por outro lado, tem sido demonstrado para várias espécies como o rato (CARDULLO ; CONE, 1986), humanos (NG et al, 1990), e camundongo (KATKOV ; MAZUR, 1998) que a centrifugação é um passo potencial nos danos aos espermatozóides durante o processamento do sêmen. Especificamente, isso foi demonstrado quando o pellet centrifugado selecionou populações de espermatozóides humanos causando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no pellet, que induziu danos irreversíveis ao espermatozóide e ao comprometimento de sua capacidade de fertilização *in vitro* (AITKEN ; CLARKSON, 1988).

Estudos realizados em equinos obtiveram diferenças significativas entre os tratamentos utilizando o mesmo tempo de conservação durante o resfriamento. A sobrevivência das células espermáticas foi superior com a diluição, mas os melhores resultados foram obtidos para o sêmen centrifugado. Após 72h de armazenamento sob

refrigeração, somente as amostras centrifugadas apresentaram sobrevivência superior a 25%. (MIRÓ et al., 2009)

Diversos trabalhos avaliando o efeito de diferentes regimes de centrifugação foram descritos para o sêmen humano (SHEKARRIZ et al., 1995), equino (REVELL et al., 2002) e suínos. Carvajal et al.(2004) identificaram que o regime de centrifugação tem efeito sobre a perda de espermatozóides e, portanto, influencia na recuperação dos mesmos. Usando menor força G e menores tempos de centrifugação (800 e 400 g por 3 minutos) obteve-se uma menor recuperação de espermatozóides, por causa de uma formação incompleta do pellet e, conseqüentemente, a perda de células não pelletizadas após a remoção do sobrenadante. Em contraste, o uso de mais força G e de tempos mais longos de centrifugação (2400 e 1600 g por 5 minutos) levou à sedimentação de uma maior quantidade de espermatozóides. Além disso, a porcentagem de espermatozóides recuperados obtidos com este regime permaneceu praticamente inalterada com o uso maior da força G e tempo de centrifugação reduzida (2400 g por 3 minutos). Assim os autores supracitados concluíram que o tempo de centrifugação é mais crítico que a força G utilizada, para indução de danos ao espermatozóide, assim, o uso da centrifugação por curtos períodos é recomendado no preparo do sêmen para técnicas de reprodução assistida.

1.2.5 DILUENTES

A maioria dos animais domésticos possui mais espermatozóides no ejaculado, do que o necessário para uma posterior fecundação. Dessa forma a elevada concentração espermática determina uma intensa atividade metabólica com um conseqüente acúmulo de catabólitos no plasma seminal, sendo estes prejudiciais às células espermáticas. Assim a diluição reduz a concentração espermática, promovendo uma maior proteção celular (AZEVEDO et al., 2000; NEVES et al., 1983).

Os diluentes são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos efeitos críticos da criopreservação. Um bom diluente se caracteriza pela ausência de toxicidade à célula espermática; pela isotonicidade, poder nutritivo e tampão eficaz; pelos estabilizadores de membrana; pelo pH (potencial hidrogeniônico), que favorece a sobrevivência espermática e, por último, por ser de fácil preparo e baixo custo (CONCANNON ; BATISTA, 1989).

Segundo Gibbons (2002), é imprescindível na composição de um diluente usado para congelação do sêmen uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfoxido) e não-penetrantes (leite ou gema de ovo), além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados.

Os diluentes mais populares na criopreservação de sêmen suíno são aqueles à base de glicose e gema de ovo (POLGE et al., 1970); Tris e gema de ovo (VISSER; SALAMON, 1974; OBANDO et al., 1984), BTS “Beltsville Thawing Solution” (WOELDERS, 1992; VASCONCELOS et al., 2001; HU et al., 2009) e uma solução a base de lactose acrescida de gema de ovo (BURANAAMNUAY et al., 2007; BIANCHI et al., 2008).

1.2.5.1 AÇÚCARES

Espermatozóides de mamíferos requerem substratos exógenos para desempenhar uma variedade de funções, por exemplo, para preservar as reservas de energia intracelular, os componentes celulares, e principalmente, para apoiar a motilidade (YILDIZ et al., 2000). Nesse contexto, a frutose é bastante utilizada por ser uma importante fonte de energia para os espermatozóides do ejaculado, e junto com a glicose, é encontrada no plasma seminal em muitas espécies de mamíferos (PONGLOWHAPAN et al., 2004).

Segundo Mann (1975) os espermatozóides de mamíferos podem obter energia por dois caminhos distintos, através da glicólise e do ciclo de Krebs ambos por consumo de monossacarídeos, como a glicose, frutose e manose. Apesar de todas as espécies poderem usar a maioria dos monossacarídeos para obtenção de energia, a forma específica do metabolismo varia entre as espécies (RIKMENSPOEL; CAPUTO, 1966). Os mecanismos pelos quais a glicose e a frutose agem sobre a motilidade espermática podem estar relacionados com diferentes efeitos que ambos os açúcares têm sobre o metabolismo energético global de espermatozóides.

Rigau et al., (2000) ao estudarem os efeitos da glicose e da frutose no metabolismo energético do sêmen canino, observaram que os espermatozóides são capazes de usar frutose e glicose, embora a formação de intermediários metabólicos, como a glicose-6-fosfato e ATP seja muito diferente entre as duas hexoses. A incubação de espermatozóides do cão com

frutose induziu um maior aumento nos níveis de glicose 6-fosfato intracelular do que a incubação com glicose. Esse efeito está relacionado com as diferenças acentuadas na taxa metabólica dos dois açúcares.

Sabe-se que os açúcares presentes no meio extracelular possuem propriedades crioprotetoras, porém essa capacidade do açúcar sobre a célula espermática pode variar de acordo com a temperatura de armazenamento, peso molecular do açúcar e o tipo de diluente usado (MOLINA et al., 1994).

De Mercado et al. (2010), utilizaram diferentes açúcares em diluidores para criopreservação de sêmen suíno e observaram que maiores taxas de sobrevivência espermática após a congelação e descongelação foram alcançadas com o uso de diluidores contendo rafinose ou lactose, em detrimento do uso de diluidores contendo glicose ou frutose, indicando que o maior peso molecular dos açúcares (lactose) promove uma melhora nos parâmetros seminais pós-descongelação.

Ainda foram encontrados relatos da adição de outras substâncias que não açúcares ao diluidor com o objetivo de proteger os espermatozóides contra o choque térmico. Assim, Bailey et al. (2008) demonstraram que a incorporação de colesterol através do uso das ciclodextrinas era um método promissor para aumentar a resistência do sêmen suíno às baixas temperaturas. Além disso, outras formas de colesterol e moléculas transportadoras, como lipoproteínas ou lipossomas, também devem ser consideradas como rotas alternativas transitórias para aumentar a relação colesterol: fosfolipídios da membrana plasmática. Ainda a inclusão de outras moléculas protetoras, tais como a trealose e antioxidantes, devem também ser investigada tendo em vista sua capacidade de conservar ou aumentar a funcionalidade dos espermatozóides suínos durante criopreservação.

1.2.6 CRIOPROTETOR

A composição da membrana plasmática do espermatozóide suíno difere da membrana plasmática de outros mamíferos, como por exemplo a do touro, que são mais resistentes a congelação. Essa diferença está relacionada ao tipo de fosfolipídio predominante e à relação colesterol/fosfolipídio (PARKS; LYNCH, 1992). As espécies de animais cujos

espermatozóides possuem maior resistência à congelação contêm uma alta relação colesterol/fosfolipídio na membrana (BUHR et al., 1994; BUHR et al., 2000).

O processo de criopreservação promove danos na capacidade funcional dos espermatozóides causados pelo choque térmico, o que leva a uma diminuição da fertilidade (ALTHOUSE et al., 1998; JOHNSON et al., 2000; WATSON, 2000). 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). As alterações decorrentes do choque térmico e estresse osmótico irão promover alterações estruturais e funcionais da célula espermática (PURSEL et al., 1972; PURSEL ; JOHNSON, 1975; BUHR, 1991; BUHR et al., 1994). Tais alterações implicam em um efeito negativo sobre a motilidade espermática e sobre trocas metabólicas através das membranas celulares, que podem influenciar negativamente os processos de capacitação espermática e o mecanismo de fertilização (WATSON, 1996; NARDID et al., 1997), ou até mesmo levar à morte celular (WATSON, 1996).

No intuito de reduzir as crioinjúrias, várias substâncias foram utilizadas como crioprotetores, que são componentes comumente não encontrados nas células vivas (FULLER, 2004). De acordo com Amann (1999), os crioprotetores se classificam como penetrantes ou não-penetrantes. Um crioprotetor não-penetrante, não consegue atravessar a membrana plasmática e age extracelularmente. Assim, ele pode atuar como um soluto e reduzir a temperatura de congelação do meio. Já os crioprotetores penetrantes, são capazes de penetrar na membrana plasmática e agem intra e extracelularmente. Como são solúveis, causam a desidratação do espermatozóide devido ao fluxo de água osmoticamente direcionado. Após curtos períodos, o crioprotetor e a água se equilibram, resultando em iguais concentrações extra e intracelulares. Para Ashwood-Smith (1987), a classificação dos crioprotetores se dá em dois grupos: alcoois (etilenoglicol, glicerol, etc.) e amidas, ambos enquadrados como crioprotetores penetrantes na classificação anteriormente citada. Esse mesmo autor sugeriu ainda que um crioprotetor ideal deve possuir um baixo peso molecular, boa solubilidade em água e mínima toxicidade aos espermatozóides.

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) é um álcool que contém três grupos funcionais hidroxila, que podem aceitar o 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 devido à alta

viscosidade da solução, responsável pela penetração mais lenta do crioprotetor na membrana plasmática, induzindo estresse osmótico (GILMORE et al., 1995; KAROW, 2001). Todavia, sabe-se que os crioprotetores podem apresentar níveis de toxicidade dependentes de sua concentração e da duração da exposição das células a estes agentes, o que denota a importância da identificação da concentração ideal que balanceie a toxicidade e a ótima crioproteção (FULLER, 2004).

Assim, apesar do glicerol ser o crioprotetor eletivo utilizado para o sêmen de diferentes espécies (ALVARENGA et al., 2005), esta substância apresenta-se tóxica aos espermatozoides (HOLT, 2000). Tal toxicidade pode resultar em desnaturação protéica, alteração das 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. 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). No caso específico do espermatozoides suíno, estas células utilizam o glicerol como fonte de carbono, mesmo na presença de outros substratos como a glicose (ÓSHEA et al., 1979). O caminho para a utilização do glicerol não é através da glicólise, provavelmente devido à baixa atividade da quinase do glicerol observada nos espermatozoides (JONES et al., 1992). Em vez disso, a via não-glicolítica de metabolismo do glicerol resulta no acúmulo de metabólitos tóxicos como metilglioxal (RIDDLE ; LORENZ, 1973). Este promove a ativação de fosfolipases e proteases causando danos irreversíveis à célula (RIDDLE E LORENZ, 1973; JONES et al., 1992).

1.2.7 CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAÇÃO

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)

Sendo o suíno a espécie doméstica filogeneticamente mais próxima do cateto, torna-se importante conhecer mais sobre essa espécie. Assim, muitos autores relatam que há diferenças na bicamada lipídica da membrana do espermatozóide suíno que podem explicar a maior susceptibilidade do mesmo ao choque pelo resfriamento (WATSON, 1995). Entre as principais diferenças pode-se citar uma menor porcentagem das moléculas de colesterol (PAULENZ et al., 1999) e sua distribuição de maneira assimétrica na membrana, tendo uma maior quantidade na monocamada interna do que na monocamada externa (JOHNSON et al., 2000), uma quantidade menor de fosfatidilcolina e uma quantidade maior de fosfatidiletanolamina e esfingomiélinina, além de diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios que possuem poucas duplas ligações do tipo *cis*. Estas diferenças estruturais ajudam a explicar a alta sensibilidade do espermatozóide suíno ao choque pelo frio, que leva a um aumento da permeabilidade da membrana e conseqüente perda de cátions e enzimas através da mesma, redução da atividade enzimática e dos processos de difusão controlados pela membrana além das mudanças no movimento lateral de canais (JOHNSON et al., 2000).

A velocidade de congelação deve ser -30°C/ minuto e a velocidade de descongelação de 1200°C/ minuto (JOHNSON et al., 2000). Outro conceito aceito entre os pesquisadores da área, diz respeito ao envase, que deve ser efetuado em palhetas de 0,5 ml; pois, os resultados são superiores a pellets ou palhetas maiores (JOHNSON et al., 2000).

Um método de criopreservação bastante usado é o descrito por Sellés et al., (2003) onde logo após a coleta do sêmen é realizada uma diluição inicial, seguida do resfriamento em caixas isotérmicas de poliestireno por 150 minutos até 15°C, seguido de mais 90 minutos no refrigerador até atingir 5°C. Nesse momento, as amostras são submetidas a uma nova

diluição, utilizando o volume restante de diluente, porém contendo 6% de glicerol, no intuito de atingir uma concentração final de 3% do crioprotetor no diluente. Essas diluições são realizadas objetivando-se atingir uma concentração final de 100×10^6 espermatozóides por mL. A partir desse momento o sêmen é envasado em palhetas de 0,5 mL e exposto ao vapor do nitrogênio a 3 cm de altura da superfície do nitrogênio líquido, por 20 minutos. Finalmente, as palhetas são acondicionadas em botijão criobiológico.

A qualidade do sêmen após criopreservação é afetada por uma série de fatores, incluindo o tipo de recipiente no qual o sêmen é acondicionado (BWANGA et al. 1991). Em geral, os recipientes com uma relação maior de superfície-volume, como palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL, permite uma maior homogeneidade de temperatura de congelação e descongelação em todas as amostras. Assim, o sêmen congelado-descongelado em pequenas embalagens apresenta menos danos do que os congelados em embalagens de maior volume (ERIKSSON, 2000). No entanto, os recipientes de menor volume contém relativamente menor quantidade de espermatozóides, geralmente cerca de $250-500 \times 10^6$ de espermatozóides por palheta. Estes não são suficientes para uma dose única usada na inseminação artificial convencional em suínos. Recentemente, um novo recipiente de plástico com um tamanho maior (Flatpack; Medical Device & AB, Uppsala, Suécia) foi desenvolvido (ERIKSSON; RODRIGUEZ - MARTINEZ 2000), o que pode melhorar ligeiramente a qualidade e a fertilidade *in vivo* do sêmen congelado e descongelado do varrão. Contudo, inseminação com grande número de espermatozóides por dose, como $5000-6000 \times 10^6$, reduz o número de doses inseminantes por ejaculado.

Buranaamnuay et al. (2008), estudando o efeito de diferentes volumes de palhetas, verificou uma melhora na viabilidade espermática e integridade da porção apical do acrossoma (NAR) do sêmen congelado descongelado quando envasados em palhetas de 0,5 mL comparado as de 0,25mL. Por outro lado, não foi verificada diferença entre os parâmetros motilidade e integridade de membrana.

A taxa de descongelação é um importante fator que afeta a qualidade do sêmen criopreservado (TULI et al., 1991). Tal taxa ideal visa a recuperação de uma maior proporção de espermatozóides sendo variável de acordo com a espécie. Segundo Mocé et al. (2003), que avaliaram as taxas de descongelação de 50°C e 70°C ambas durante 10-12 s para o semen de coelhos, as melhores taxas de fertilidade e prolificidade são alcançadas com a descongelação a 50°C. Vidament et al. (2001), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen equino

descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelção (37°C /30s, 50 °C/ 10s, 50 °C/20s, 60°C/ 10s, 75 °C/ 5s, 75°C/10s e 75°C/15s), não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para a descongelção a 75 °C/15s, que diferiu dos demais, quando a motilidade foi zero. Em bovinos, as taxas de descongelção de 5 °C/10 min., 20 °C/4 min., 35° C/4 min., 50 °C/75 s, 65 °C/48 s., 80 °C/37 s e 100 °C/20s foram comparadas, sendo que as taxas de 20 °C/4 min. e 35 °C/4 min. promoveram as maiores porcentagens de espermatozóides moveis e de acrossomas intactos (OLAR et al., 1977).

Vários autores têm investigado o efeito de diferentes processos de descongelção de sêmen suíno acondicionado em palhetas de 5 mL (SALAMON et al., 1973; WESTENDORF et al., 1975). A maioria das palhetas é descongelada em temperaturas variando de 35-90°C e tempos que variam de 6-120 s (WESTENDORF et al., 1975; PURSEL ; PARK, 1987; CORCUERA, 1996; ERIKSSON ; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Esses estudos têm foco na avaliação da motilidade, morfologia do acrossoma e integridade da membrana para avaliar a qualidade do sêmen. No entanto, outros parâmetros relacionados com a fertilidade também podem ser influenciados por diferentes processos de descongelção. Parâmetros da fertilização *in vitro* tais como monospermia ou polispermia pode fornecer informações adicionais sobre o estado funcional dos espermatozóides (CÓRDOVA et al., 2001, 2002; SELLÉS et al., 2003).

Um aumento da taxa de descongelção tem mostrado reduzir a recristalização do gelo intracelular, um processo que pode levar à formação de maiores e mais estáveis cristais de gelo que podem danificar as mitocôndrias (COURTENS ; PAQUIGNON, 1985; FISER ; FAIRFULL, 1990). Por outro lado, o aquecimento rápido pode provocar estresse osmótico sobre os espermatozóides por causa do derretimento abrupto da solução extracelular, que pode causar desequilíbrio nas taxas de influxo de água e saída dos crioprotetores, podendo levar a edemaciação e lise das células espermáticas (HAMMERSTEDT et al. 1978; MAZUR, 1984).

A taxa de descongelção tem uma influência na viabilidade espermática, e estudos mostram que o aumento da taxa de descongelção melhora a motilidade e reduz a quantidade de alterações acrossômicas (PURSEL; JOHNSON, 1975; FISER et al., 1993; ERIKSSON ; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Em estudos recentes, Córdoba et al. (2006) encontraram um aumento na motilidade quando a temperatura foi elevada de 42-50 °C, ambas durante 40s, esses resultados corroboram com o pensamento acima. Melhoria na motilidade seminal pode ser atribuída a uma redução da recristalização dos danos celulares. No entanto, esses mesmos

autores não observaram nenhuma alteração na crista apical do acrossoma entre as duas taxas de descongelamento, isso provavelmente é atribuído a valores próximos entre as duas temperaturas de descongelamento testadas.

Nos catetos, não há nenhuma informação em relação ao consumo de açúcar pelos espermatozoides, nem da interferência do processo de centrifugação sobre a qualidade do sêmen, bem como, da taxa de descongelamento ideal. Assim, no intuito de alcançar o uso mais eficaz do sêmen congelado, é importante estudar a influência dos fatores supracitados sobre a qualidade seminal da espécie.

1.2.8 OBJETIVOS

1.2.8.1 Geral

Estabelecer um protocolo para o processamento do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) visando à criopreservação

1.2.8.2 Específicos

Estudar o efeito da centrifugação sobre a qualidade do sêmen de catetos antes e após criopreservação;

Avaliar o efeito de diluentes a base de Tris suplementados com diferentes açúcares (frutose e glicose) sobre a qualidade do sêmen de catetos antes e após criopreservação.

Avaliar a interação entre os diluentes à base de tris suplementado com diferentes açúcares e diferentes taxas de descongelação (37° C / 1 min e 55 ° C 7s).

1.2.9 REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining of the efficiency of sperm preparation technique. **J Androl.**, v. 9, p. 367–376, 1988.

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: 03 Abr.2009.

ALMLID, T.; HOFMO, P.O. A brief review of frozen semen applications under Norwegian AI swine conditions. **Reprod Domest Anim.**, 1996;v. 31, p. 169– 73, 1996.

ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 535-543, 1998.

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.

ALVAREZ, J.G.; LASSO, J.L.; BLASCO, L.; NUNEZ, R.C.; HEYNER, S.; CABALLERO, P.; STOREY, B.T. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile life. **Hum Reprod.**, 1993;v. 8, p. 1087–1092, 1993.

ALVES, S.G.G.; SNOECK, P.P.N.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. **In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, 15., Porto Seguro, Brasil. **Abstracts...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 508.

AMANN, R. P. Cryopreservation of sperm. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). **Encyclopedia of Reproduction**. Burlington: **Academic press**, p.773-783, 1999.

ASWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **In: BOWLER, K.; FULLER, B.J. (Eds.). Temperature and Animal Cells**. Cambridge: Biologists Ltd. p. 395-406, 1987

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.; LESSARD, C.; JOANNIE JACQUES, J.; CHRISTELLE BREQUE, C.; OBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251–1259, 2008.

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.

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

BELLATONI, E. **Habitat use by mule deer and collared peccaries in an urban environment**; Report 42. Tucson: University of Arizona, 1991. p. 2-33.

BENIRSHCHKE, K. Quest for the giant peccary: the chaco revisited. **Zoonosis**, v. 25, p. 364-372, 1974.

BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 2, 1991, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 1991, p.81-93.

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.

BUHR, M.M.; HE, L.; KASIMANICKAM, V. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. In: international conference boar semen preservation, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.61-69.

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.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; DA ROSA ULGUIM, R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORREA, E.K.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORREA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 632–638, 2008.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.3, p.213-218, 2005.

BLOM, E. A one minute live dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertil. Steril.**, v. 1, p. 176-177, 1950.

BODMER, R.E.; SOWLS, L.K. in **Status survey and conservation action plan: Pigs, Peccaries and Hippos**. (Oliver, W.L.R. ed.) IUCN: Gland, Switzerland, 1993. 202.

BODMER, R.E.; PUERTAS, P.; AQUINO, R.; REYES, C.; FANG, T.; GOTTDENKER, N. Manejo y uso sustentable de peccaries em La Amazonia Peruana. **Occasional Paper of the IUCN. Species Survival Commission**. N.18, 1997.

BRAUN, J.; TORRES-BOGGINO, F.; HOCHI, S.; OGURI, N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Dtsch Tierärztl Wschr.**, v. 101, p. 319–22, 1994.

BURANAAMNUAY, K., TUMMARUK, P., SINGLOR, J., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., TECHAKUMPHU, M. Effects of Straw Volume and Equex-STM on Boar Sperm Quality after Cryopreservation. **Reprod Dom Anim**. p.1439-0531.2007

BURANAAMNUAY, K.; TUMMARUK, P.; SINGLOR, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TECHAKUMPHU, M. Effects of Straw Volume and Equex-STM on Boar Sperm Quality after Cryopreservation. **Reprod Dom Anim.**, v. 44, p. 69–73, 2009.

BWANGA, C.O. Cryopreservation of Boar Semen: Studies on Freezing, Packaging and Fertilizing Capacity [**doctoral thesis**]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences; 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** v. 32, p. 455–461.

CARDULLO, R.A.; CONE, R.A. Mechanical immobilization of rat sperm does not exchange their oxygen consumption rate. **Biol Reprod**. v. 34, p. 820–830, 1986.

CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; MARIA, J.; EMILIO, V.; MARTINEZ, A.; ROCA, J. Effects of Centrifugation Before Freezing on Boar Sperm Cryosurvival **Journal of Andrology**, V. 25, No. 3, May/June 2004

CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v. 58, p. 1587–95, 2002.

CASTELLANOS, H.G. Aspectos de la organización social Del baquiro de collar, *Tayassu tajacu* L., em el estado Guarico-Venezuela. **Acta Biológica Venezuelica** v. 11, p.127-143, 1983.

CAVALCANTE FILHO. **Morfologia dos estômagos do queixada (*Tayassu pecari*) e do cateto (*Tayassu tajacu*) (Linnaeus, 1789)**. 1996. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo, 1996.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. 1991. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 115–161.

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

CORCUERA, B.D., 1996. Efecto de la presión osmótica de los diluyentes de congelación sobre la viabilidad del espermatozoide de verraco. Thesis. U.C.M., School of Biological Sciences, Madrid.

CÓRDOVA, A.; PÉREZ, J.F.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; MARTÍN RILLO, S. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5ml straws. **Reprod. Dom. Anim.** 36, 199–202, 2001.

CÓRDOVA, A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; ALVAREZ, A.; DROBCHAK, V.; MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5ml straws. **Theriogenology**. 57, 2119–2128, 2002.

CÓRDOVA, I.A.; OLIVA, J.H.; LLEÓ, B.; GARCÍA, A.C.; CORCUERA, B.D.; PÉREZ, G.J.F. Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5ml straws. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 145–154, 2006.

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

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotropica**, v.5, n.2, 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. (In press)

COURTENS, J.L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen and frozenthawed spermatozoa of the boar. In: Johnson, L.A.. Larson, K. (Ed.) Deep freezing of boar semen. **Swedish University Agriculture Science**, Uppsala, p.61-87, 1985.

DE MERCADO, E.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ, E.; SANZ, E. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. **Anim Reprod Sci.**, v. 118, p.54-61, 2010.

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

DEUTSCH, L.A.; PUGLIA, L.R.R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Editora Globo, 1988. 191 p.

DOBRANIĆ, T.; SAMARDŽIJA, M.; CERGOLJ, M.; PRVANOVIĆ, N. Determination of membrane integrity of canine spermatozoa. **Veterinarski arhiv**, v.75, n.1, p.23-30, 2005.

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.

ERIKSSON, B.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 205–220, 2000.

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

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species (Review). **Eur J Wildl Res.**, v. 53, p. 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.**, v. 25, p. 123– 129, 1990.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; HANSEN, C.; PANICH, P.L.; SHRESTHA, J.N.B.; UNDERHILL, L. The effect of warming velocity on motility and acrosome integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 34, p. 190–195, 1993.

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

GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v.4, n.16, p.24-32, 2002.

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.

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

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

HELLGREEN, E.C.; LOCHMILLER, M.S.; AMOSS, J.R.; GRANT, W.E. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*), **J Reprod Fertil.**, v. 85, p.677–686, 1989.

HEWITT, D.A.; LEAHY, R.; SHELDON, I.M.; ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Animal Reproduction Science**. V.67, p.101-111, 2001.

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

HU, J.H.; LI, Q.W.; LI, G.; JIANG, Z.L.; BU, S.H.; YANG, H.; WANG, L.Q. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 107–118, 2009.

IBAMA (Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis e do Meio MAbiente). **Lista oficial de animais ameaçados de extinção**. Disponível em: <HTTP://www.ibama.gov.br/>. Acessado em: 03 Abr.2009.

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.

JONES, A.R; CHANTRIL, L.; COKINAKIS, A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** v. 94, p. 129–134, 1992.

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.

KATKOV, I.I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. **J Androl.**, v. 19, p. 232–241, 1998.

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.

LARSSON K, EINARSSON S, SWENSSON T. The development of a practicable method for deep freezing of boar spermatozoa. **Nord Vet Med.**, v. 29, p. 112–118, 1977.

MASTROMONACO, G.F.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L. The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zone penetration by domestic dog spermatozoa. **Theriogenology**. v.57, p.1123-1134, 2002.

MAYENCO-AGUIRRE, A.M.; PÉREZ CORTÉS, A.B. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.50, p.195-204, 1998.

MAYER, J.J.; WETZEL, R.M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species**. v. 293, p. 1-7. 1987.

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**. v. 147, p. 268-275, 2006.

MEDEIROS, A. A. **Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 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.

METCALF, S. Assisted reproduction in the bitch. 1999. Thesis (Doutorado), Faculty of Science, Australia, 161p, 1999.

MIRO´ J., ET AL. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology** (2009), doi:[10.1016/j.theriogenology.2009.06.012](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.012)

MOCÉ, E.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 60, p. 115-123, 2003.

MOLINA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. In vitro evaluation zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reprod Nutr Dev.**, v. 34, p. 491–500, 1994.

MORAIS, R. N.; MUCIOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus*

pardalis), margay (*L. weidii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 2027-2041, 2002.

MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). **Braz. J. Vet.. Res. Anim. Sc.**, v. 35, n. 4, p. 178-181, 1998.

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

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. **In:** GONCALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 2008. 395 p.

NG, S.C.; BONGSO, T.A.; SATHANANTHAN, H.; TOK, V.C.N.; RATNAM, S.S. Microcentrifugation of human spermatozoa: its effect on fertilization of hamster oocytes after micro-insemination spermatozoal transfer. **Hum Reprod.**, v. 5, p. 209–211, 1990.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; CUNHA-NOGUEIRA, S.S.; TAKECHI, S.A. Estrutura social de pecaris (Mammalia, Tayassuidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, 1, 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**, 31, 2, 188-195, 2000.

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

OBANDO, H.; TAMAYO, T.; ALVARO, C. Evaluation of some factors affecting swine spermatozoa during freezing. **In:** Proceedings of the Tenth International Congress on Animal Reproduction AI, Urbana, v. 2, p. 193, 1984.

OLAR, T. T.; BECKER, W. C.; SENGGER, P. L. Effects of thawing rate and cold post-thaw temperatures on bovine semen packaged in glass ampules. **J. Anim. Sci.**, v. 44, p. 95-101, 1977.

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 espermatozoides 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.

ORR, R.T. **Biologia dos Vertebrados**. 5 ed. San Francisco – California: Academy of Sciences, 1986. P.242.

PAQUIGNON, M.; COUROT, M. Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. **In:** 8th International Congress on Animal Reproductive Artificial Insemination, Cracow, Poland. v. 4, p. 1041–1044, 1976.

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

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255–266, 1992

PAULENZ, H.; TAUGBOL, O.; KOMMISRUDE, E.; GREVLE, I.S. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reprod Dom Anim**, v.34, p.431-435, 1999.

PELLICER-RUBIO, M.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **J Reprod Fertil.**, v. 112, p. 95–105, 1998.

PEREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCIA-CASADO, P. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**. v.56, p.387-398, 2001.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENG, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil Steril.**, v. 26, p. 167–74, 1975.

PLATZ, C. C.; SEAGER, S. W. J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **J. Am. Vet. Med. A.**, v. 173, p.1353-1355, 1978.

POLGE, C.; SALAMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. **Vet. Rec.** v. 87, p. 424–429, 1970.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1498–1517, 2004.

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

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock, **J. Anim. Sci.** v. 34, p. 278-283, 1972.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 99-102, 1975.

PURSEL, V.G.; PARK, C.S. Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5ml maxi-straws. **Theriogenology**, v. 28, p. 683–690, 1987.

REVELL, S.G.; MRODE, R. A. An osmotic test resistance for bovine semen. **Anim Reprod Sci.**, v. 36, p. 77-86, 1994.

REVELL, S.G.; ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; CAMUS, A. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. **In:** proceedings of the 14th Meeting European A.I. Vets. Lugo, Spain, 2002

RIDDLE, V.M.; LORENZ, F.W. Nonenzymatic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxyacetone in Ringer's phosphate suspension of avian spermatozoa, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 50, p. 27–34, 1973.

RIGAU, T.; CAMPRUBI, M.; BADIA, J.; BALLESTER, J.; PALOMO, M. J.; RIVERA, M.; IZQUIERDO, D.; PEÑA, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Differential effects of fructose and glucose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. **In:** Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction. Stocholm, 2000, p. 90 [abstract].

RIKMENSPOEL, R.; CAPUTO, R. The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinases in bull spermatozoa. **J Reprod Fertil.**, v. 12, p. 437–444, 1966.

RODRIGUES-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine estructure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** Suppl. 47, p.279-285, 1993.

SALAMON, S.; WILMUT, I.; POLGE, C. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 26, p. 219–230, 1973.

SALVIANO, M. B., SOUZA, J. A. T. Avaliacao andrologica e tecnologia do semen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 12, n. 3, p. 159-167, 2008.

SANTOS, T.C. **A relação materno-fetal em Tayassuidae: catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu pecari* Link, 1795).** 2002. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de cirurgia, São Paulo.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.

SANTOS, R.R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery, of gonadal function after autotransplantation.** 2007. 144f. Thesis (Doctorat) – Utrecht, The Netherlands, 2007.

SEAGER, S. W., FIETCHER, W. S. - Collection, storage, and insemination of canine semen. **Lab Anim Sci**, v.22, n. 2, p.177-82, Apr. 1972.

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.

SERRES, C.; RODRÍGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I.; GABRIEL, J.; GÓMEZ-CUÉTARA, C.; MATEOS, E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leone's donkey semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 329–32, 2002.

SHEKARRIZ, M.; DE WIRE, D.M.; THOMAS ,A.J.; AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **Eur Urol**, v. 28, p. 31–35, 1995.

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

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.

SOUSA, A L P. **Características do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) coletados por eletroejaculação utilizando diferentes protocolos anestésicos.88f,2008.** Tese de dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN- 2008

SOUSA, 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.**, v. 116, p.370–375, 2009.

SOWLS, L.K. Gestation period of collared peccary. **Journal of mamology**, v.42, n.3, p.425-426, 1961.

SOWLS, L.K. **The Peccaries**. Tucson: The University of Arizona Press, 1984.

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

STROM, 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.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of 5700D asperm motility inhibiting factor for seminal plasma of boar. **Anim Reprod Sci.**, v. 29, p. 35–52, 1992.

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.

TABER, A.B.; DONCASTER, C.P.; NERIS, N.N.; COLMAN, F.H. Ranging behavior and population dynamics of the Chacoan peccary, *Catagonus wagneri*. **Mammalia**, 58, 61-71, 1993.

TEBET, J.M.; MARTINS, M. I. M.; CHIRINEA, V. H.; SOUZA, F. F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M. D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa, *Theriogenology*, v. 66, p.1629-1632, 2006.

TULI, R. K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 25, p. 125-131, 1991.

VASCONCELOS, A.M.M.A.; MORAES, G.V.; MOREIRA, I.; RIGOLON, L.P.; MARTINS, E.L. Características Espermáticas de Sêmen Resfriado de Suíno e Conservado em Diferentes Diluentes. **Rev. bras. zootec.**, v. 30, p. 394-401, 2001.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, . Advances in cryopreservation os stallion semen in modified INRA 82. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 201-218, 2001.

VISSER, D.; SALAMON, S. Effect of composition of tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep-freezing. **Aust. J. Biol. Sci.** v. 27, p. 485–497, 1974.

WALLACH, J.P.; BOEVER, W.J. **Diseases of Exotic Animals: Medical and surgical management.** Philadelphia, W.B. Saunders, 1983. P.631-632.

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

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

WESTENDORF, P.; RITCHER, L.; TREU, H.; ZUR. Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülseberger Paillettenverfahren. **DtschTieraerztl Wschr.**, v. 82, p. 261–267, 19975.

WISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. **Anim Reprod Sci.**, v. 29, p. 185–94, 1992.

WISLOCKI, G.B.; DEMPSEY, E.W. Histochemical reactions of the placenta of the pig. **American Journal of Anatomy**, v.78, p. 181-225, 1931.

WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **PIGS - Misset**, v. 8, p. 22-23, 1992.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T.. Influence of the sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579–585, 2000.

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

2 CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DE DILUENTES SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES AÇÚCARES E DA TAXA DE DESCONGELAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SEMEN DE CATETOS (*TAYASSU TAJACU*)

2.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de açúcar ao diluente, e da taxa de descongelação sobre a qualidade do sêmen congelado-descongelado obtidos de catetos (*Tayassu tajacu*). O sêmen de 13 catetos machos sexualmente maduros foram coletados por eletroejaculação e avaliados para motilidade, vigor, viabilidade espermática, integridade da membrana e morfologia dos espermatozóides. O sêmen foi dividido em duas alíquotas: a primeira foi diluída em tris acrescido de frutose e a outra em tris acrescido de glicose. Gema de ovo (20%) e glicerol (6%) foram adicionados para ambos os grupos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas usando duas taxas de descongelação (37 ° C / 1 min e 55 ° C / 7 s). Os resultados não apresentaram diferenças entre os diluentes suplementados com frutose ou glicose após diluição, refrigeração ou adição de glicerol ($P > 0,05$), e nenhuma interação entre a suplementação de açúcar e as taxas de descongelação foi observada para qualquer parâmetro seminal avaliado ($P > 0,05$). Em conclusão, o sêmen de catetos pode ser congelado em diluente Tris suplementado com frutose ou glicose e descongelado com diferentes taxas de descongelação (37° C/1m ou 55° C/7s).

Palavras chave: *Tayassu tajacu*, sêmen, criopreservação, suplementação de açúcar.

2.2 INTRODUÇÃO

Algumas espécies selvagens, dentre elas o cateto (*Tayassu tajacu*), estão ameaçadas pela caça predatória por causa do grande valor internacional de sua carne e pele (BODMER et al., 1990). Neste contexto, a biotecnologia tem um tremendo potencial como ferramenta que ajuda na conservação de animais selvagens (SILVA et al., 2004). Essas biotécnicas que são rotineiramente usadas nas espécies domésticas não são facilmente adaptadas para vida selvagem, devido a falta de conhecimento sobre a anatomia, morfologia e mecanismos que regulam o sucesso reprodutivo de animais silvestres (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004).

Mesmo que os catetos sejam vistos como porcos, eles não pertencem à família dos suídeos. Esses animais são membros da família Tayassuidae que habitam os desertos, savanas áridas e florestas dos Estados Unidos à Argentina (ORR, 1986). Atualmente, há um aumento no interesse sobre a criação legalizada desta espécie, mas práticas de manejo adequadas ainda não foram desenvolvidas para os mesmos (MAYOR et al., 2007). As tecnologias de sêmen para esses animais se restringem ao estabelecimento de protocolos para coleta e avaliação de sêmen (HELLGREEN et al., 1989; SOUSA et al., 2009) e nenhuma informação sobre a criopreservação está disponível.

Uma intensa investigação é necessária para o desenvolvimento de métodos de preservação confiáveis em animais selvagens. Essa investigação precisa ter ênfase nas variações espécie-específicas encontradas na fisiologia celular dos espermatozoides, bem como sobre as transformações específicas que gametas sofrem durante a refrigeração, congelação e descongelação (FICKEL et al., 2007). Entre os fatores que são críticos para o congelamento de uma amostra de sêmen, o diluidor também merece consideração. Diferentes diluidores têm sido utilizados para as espécies de mamíferos, mas um diluidor perfeito ainda não foi encontrado. No entanto, o diluente Tris-base tornaram-se mais universal, e nesse meio buffering combinado com gema de ovo e glicerol foram amplamente testados para as diferentes espécies como bovinos (ANDRABI, 2007), canino (SILVA et al., 2002) e suína (HU et al., 2009).

Além disso, o sêmen criopreservado apresenta uma redução significativa da viabilidade após a descongelação, procedimento este que pode provocar danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides (SALAMON; MAXWELL, 1995).

Portanto, vários estudos têm sido conduzidos a fim de determinar a taxa ideal para a descongelação do sêmen de diferentes animais, como o varrão (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000), o carneiro (PAULENZ et al., 2004) e os cães (NÖTHLING; SHUTTLEWORTH R, 2005). O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da taxa de descongelação sobre a criopreservação de sêmen de catetos usando diluentes a base de Tris.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Treze catetos machos sexualmente maduros, com uma média de idade e peso de $40,7 \pm 1,6$ meses e $22,5 \pm 2,8$ kg, respectivamente, foram utilizados. Os animais pertenciam ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil, $5^{\circ} 10'S$, $37^{\circ} 10'W$). O clima é tipicamente semi-árido com uma temperatura média anual de $27^{\circ} C$. Os animais foram isolados das fêmeas 6 meses antes do início do estudo e mantidos sob fotoperíodo natural de 12 h. Eles foram mantidos ao ar livre, em grupos de seis animais em piquetes ($20 m \times 3 m$), com uma área coberta ($3 m \times 3 m$). Os animais foram alimentados com ração e frutas. A água era de acesso livre.

2.3.2 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum por 12 h antes do início do experimento. Em seguida, foram contidos fisicamente usando um puçá e anestesiados com propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) com 5 mg/kg em bolus (SOUSA et al., 2009). Quando o animal apresentou sinais de despertar, 1/4 da respectiva dosagem foi administrada para manter o animal em um estado anestésico ideal. Durante o procedimento, um cateter foi inserido na veia cefálica para fluidoterapia (solução salina fisiológica a 0,9%), e os parâmetros

fisiológicos como frequência de cardíaca e respiratória, além da temperatura retal foram monitorados.

2.3.3 Coleta de sêmen

Os animais foram mantidos em decúbito lateral, e o sêmen foi coletado usando um eletroejaculador (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brasil), ligado a uma fonte de 12-V. O ciclo de estimulação era composto por 10 estímulos em cada tensão, a partir de 5 V, seguido por um aumento de tensão em sequência de 1 V até 12 V. Os estímulos foram mantidos por uma duração de 10 min a partir do início do procedimento. A sonda do eletroejaculador media 15 centímetros x 1,3 cm, e 12 cm foram inseridos no reto do macho. O sêmen foi coletado em tubos plásticos e imediatamente avaliado.

2.3.4 Avaliação seminal

O volume do sêmen foi mensurado por micropipetas. A cor do sêmen foi anotada, e seu pH foi determinado usando fitas indicadoras de pH (Neutralit®, da Merck, Bucareste, Roménia). A motilidade (%) e o vigor espermático (0-5) foram avaliados imediatamente sob microscopia de luz a 100× 400× de ampliação. Esfregaços de Rosa Bengala foram preparados com 5µl de sêmen para avaliar a morfologia espermática e a integridade acrossomal utilizando microscopia de luz (1000×), sendo contadas 200 células por lâmina. Os defeitos morfológicos detectados nas células espermáticas foram classificados como primários ou secundários. A porcentagem de espermatozoides vivos foi estabelecida através da análise de uma lâmina corada com azul de bromofenol sob microscopia de luz (400×), sendo realizada a contagem de 200 células por lâmina. Após avaliação inicial, uma alíquota de 10-µL de sêmen foi diluída em solução salina formalizada a 10% (2 mL) e a concentração espermática (espermatozoides × 10⁶/mL) foi determinada utilizando uma câmara de contagem de Neubauer. A integridade funcional da membrana espermática foi avaliada por um teste hiposmótico utilizando água destilada (0 mOsm/L) como solução hiposmótica (QUINTELA et al., 2004). Uma alíquota de 0,01 mL de sêmen foi diluída em 0,09 ml de solução hiposmótica e mantida em banho Maria

a 38 °C. Após 45 min, uma alíquota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina de vidro, coberta por uma lamínula, e avaliada por microscopia de contraste de fase (400×), nesse processo 200 células foram avaliadas. Espermatozóides que apresentaram edamaciação e caudas enroladas foram considerados como tendo a membrana espermática funcional.

2.3.5 Diluentes

Os reagentes utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Dois diluentes padronizados para outras espécies foram testados neste estudo. O primeiro diluente consistiu de 3,028 g de Tris-hidroximetil-aminomethane (Tris), 1,78 g de ácido cítrico monoidratado, e 1,25 g de D-frutose dissolvidas em 100 ml de água ultrapura (Tris-frutose) (HU et al., 2009). O outro diluente consistiu de 2,4 g de Tris, 1,4 g de ácido cítrico monoidratado, e 0,8 g de glicose dissolvida em 100 ml de água ultrapura (Tris-glucose) (ROTA et al., 1997). A osmolaridade dos diluentes foi 295 mOsm / L, e o pH foi 6,6. Vinte por cento de ambas as soluções foram, então, substituídas por gema de ovo (v / v).

2.3.6 Processamento do sêmen

O sêmen foi inicialmente diluído em tris-frutose ou tris-glicose acrescido de gema de ovo (20%) à temperatura ambiente (27 ° C). As amostras foram equilibradas por 240 minutos até atingir 5 ° C em uma geladeira. Após o resfriamento do sêmen, foi adicionado Tris-gema de ovo acrescido de 6% de glicerol (também a 5 ° C), resultando em uma concentração final de 3% de glicerol no diluente. A diluição final resultou em uma concentração espermática de 100×10^6 espermatozóides / ml. As amostras foram acondicionadas em palhetas plásticas de 0,25 ml, que foram colocados horizontalmente em uma caixa térmica por 20 min, 3 cm acima do nitrogênio líquido (N₂) em contato com o vapor. Finalmente, as palhetas foram mergulhadas em N₂ líquido para o armazenamento (SELLÉS et al., 2003).

2.3.7 Processos de descongelção

Depois de uma semana, as amostras congeladas em ambos os diluentes foram descongeladas em duas taxas de descongelção. No primeiro caso, as palhetas foram imersas em banho-maria a 37°C /1min. No segundo, as palhetas foram imersas em banho-maria a 55°C/7s, seguido de mais 30 s, a 37 °C. O sêmen foi imediatamente avaliado para motilidade , vigor, porcentagem de células vivas, morfologia, integridades acrossomal e teste de HOS.

2.3.8 Analise estatística

Doze repetições foram realizadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade pelo teste de Levene usando o procedimento univariado do Statistical Analysis System (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Para avaliar o efeito de diferentes fatores e suas interações sobre as variáveis consideradas no estudo, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento General Linear Model (GLM). Comparações entre os diferentes tratamentos sobre os parâmetros do sêmen foram analisados pelo teste de Tukey. Para todas as análises estatísticas, a significância foi estabelecida em $P < 0,05$.

2.4. RESULTADOS

2.4.1 Sêmen fresco e diluído

Vinte e uma tentativas para a coleta de sêmen foram realizadas em 13 animais, mas apenas 14 ejaculados foram obtidos, denotando uma eficiência de 66% para o processo eletroejaculatório. Dois destes ejaculados não foram utilizados no experimento devido ao

baixo volume. Os outros doze ejaculados apresentaram cor branca, aspecto aquoso e um volume de $3,7 \pm 0,5$ ml. Outras características do sêmen são apresentadas na tabela 1.

A adição dos diluentes não afetou a motilidade nem o vigor, apesar de uma diminuição nos valores desses parâmetros ter sido verificada após a adição do glicerol na refrigeração (Tabela 2). Não foram verificadas diferenças entre os diluentes suplementados com frutose ou glicose em seguida a diluição, refrigeração ou adição de glicerol ($P>0,05$).

Tabela 1: Características do sêmen fresco de catetos (*Tayassu tajacu*) coletado por eletroejaculação (n=12 ejaculados).

	Média $\pm$ E.P	Variação
Concentração espermática ($\times 10^6$)	506.6 ± 58.3	280 – 960
Motilidade espermática (%)	93.6 ± 1.6	80 – 100
Vigor (0-5)	3.7 ± 0.3	2 – 5
Espermatozoides vivos (%)	92.6 ± 2	79 – 100
Integridade de membrana (%)	66.2 ± 6.1	31 – 92
Morfologia espermática		
Normal (%)	49.6 ± 2.8	33 – 73
Alterações primárias (%)	$2,1 \pm 0.5^a$	1 – 7
Alterações secundárias (%)	48.1 ± 2.0	93 – 100
Alterações totais (%)	50.4 ± 2.8	27 – 67
Integridade acrossomal (%)	99.7 ± 0.2	98 – 100

Tabela 2: Média $\pm$ E.P da motilidade e vigor do sêmen de cateto (*Tayassu tajacu*), fresco, diluído e adicionado de glicerol usando diluente Tris suplementado com frutose ou glicose (n=12).

Sêmen	Diluidor	Motilidade (%)	Vigor (0 – 5)
Fresco		93.6 $\pm$ 1.6 ^a	3.7 $\pm$ 0.3 ^a
Diluído	Tris-frutose	88.7 $\pm$ 2.6 ^a	3.9 $\pm$ 0.2 ^a
	Tris-glicose	90.3 $\pm$ 1.9 ^a	3.7 $\pm$ 0.3 ^a
Adição de glicerol	Tris-frutose	60.0 $\pm$ 4.8 ^b	2.1 $\pm$ 0.2 ^b
	Tris-glicose	67.5 $\pm$ 5.3 ^b	2.2 $\pm$ 0.2 ^b

^{a,b} Na mesma coluna, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem estatisticamente (P < 0,05).

2.4.2 Características espermáticas pós descongelação

A Tabela 3 mostra que os procedimentos de congelação-descongelação induziram uma redução nos valores de motilidade, vigor, viabilidade espermática e integridade da membrana funcional quando comparados aos valores do sêmen fresco (P < 0,05), porém a morfologia espermática não foi afetada (P > 0,05). Além disso, não foi observada interação entre a suplementação de açúcares e as taxas de descongelação do sêmen em qualquer parâmetro avaliado P(>0,05).

Tabela 3: Média $\pm$ E.P do sêmen fresco e congelado (n=12) de catetos (*Tayassu tajacu*) usando diluente Tris suplementado com frutose ou glicose e diferentes taxas de descongelção.

	Sêmen	Descongelado a 37°C/1 min		Descongelado a 55°C/7s	
	fresco	Tris-frutose	Tris-glicose	Tris-frutose	Tris-glicose
Motilidade espermática (%)	93.6 $\pm$ 1.6 ^a	37.9 $\pm$ 4.2 ^b	28.5 $\pm$ 5.1 ^b	33.8 $\pm$ 3.7 ^b	28.2 $\pm$ 3.5 ^b
Vigor (0-5)	3.8 $\pm$ 0.3 ^a	2.3 $\pm$ 0.2 ^b	2.4 $\pm$ 0.2 ^b	2.3 $\pm$ 0.2 ^b	2.2 $\pm$ 0.3 ^b
Espermatozoides vivos (%)	92.5 $\pm$ 2.0 ^a	47.4 $\pm$ 2.6 ^b	52.3 $\pm$ 5.1 ^b	54.6 $\pm$ 3.5 ^b	53.2 $\pm$ 5.1 ^b
Integridade de membrana (%)	66.1 $\pm$ 6.1 ^a	41.7 $\pm$ 5.3 ^b	38.4 $\pm$ 4.8 ^b	34.1 $\pm$ 4.7 ^b	31.3 $\pm$ 5.5 ^b
Morfologia espermática					
Normal (%)	49.6 $\pm$ 2.8 ^a	48.7 $\pm$ 2.7 ^a	46.7 $\pm$ 2.7 ^a	53.0 $\pm$ 2.8 ^a	45.7 $\pm$ 3.0 ^a
Alterações primárias (%)	2.1 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.4 ^a	3.3 $\pm$ 0.4 ^a	2.5 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.5 ^a
Alterações secundárias (%)	48.1 $\pm$ 2.0 ^a	48.3 $\pm$ 2.8 ^a	50.6 $\pm$ 3.1 ^a	44.3 $\pm$ 3.0 ^a	50.9 $\pm$ 3.1 ^a
Alterações totais (%)	50.4 $\pm$ 2.8 ^a	51.3 $\pm$ 2.7 ^a	53.3 $\pm$ 2.7 ^a	47.0 $\pm$ 2.8 ^a	54.3 $\pm$ 3.0 ^a
Integridade acrossomal (%)	99.7 $\pm$ 0.2 ^a	99.3 $\pm$ 0.2 ^a	99.7 $\pm$ 0.2 ^a	99.4 $\pm$ 0.3 ^a	99.5 $\pm$ 0.2 ^a

^{a,b} Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem estatisticamente (P < 0,05).

2.5 DISCUSSÃO

Existe uma falta de informações acerca dos parâmetros seminais de catetos. Os resultados para o sêmen fresco obtidos neste estudo são bastante superiores aos obtidos em estudos anteriores realizados pela nossa equipe (SOUSA et al., 2009). Essa melhoria seria possivelmente devido a um aumento no tempo do processo eletroejaculatório de apenas 5 min para 10 min, o que nos permite coletar amostras com maior volume e concentração de espermatozoides.

Apesar dos catetos serem conhecidos por ser muito estressados e que o manejo sempre os ameaça, Costa e Paula (2005) coletou o sêmen destes animais através de um protocolo de eletroejaculação que durou 10 minutos e nenhum efeito colateral foi verificado para os animais. Com base nessa pesquisa, decidimos aumentar o tempo de estimulação eletroejaculatória.

Pela primeira vez, nós demonstramos que o sêmen de catetos podem ser criopreservados utilizando diluidores à base de Tris. É bem sabido que diluentes que contém Zwitterion como Tris são solúveis em água, mas impermeáveis às membranas biológicas e

também parecem ser mais resistentes às alterações no pH durante o resfriamento que em outros diluentes. Estas características permitem que diluentes à base de Tris normalmente promover uma melhor motilidade espermática pós-descongelção do que outros diluentes na preservação do sêmen de diversos mamíferos (RASUL et al., 2000). Especialmente para os catetos, destacamos que houve uma falta de informações sobre o mecanismo de ação de nenhum outro diluidor o que justifica novas pesquisas sobre este assunto.

Diluentes à base de Tris atualmente são suplementados tanto com frutose ou glicose. A frutose é pensada para ser uma importante fonte de energia para os espermatozoides, e junto com a glicose, é encontrada no plasma seminal em muitas espécies de mamíferos (PONGLOWHAPAN et al., 2004). Segundo Mann (1975), os espermatozoides de mamíferos podem obter energia através da glicólise e do ciclo de Krebs por consumo de monossacarídeos, apesar de todas as espécies poder usar a maioria dos monossacarídeos, a forma específica do metabolismo varia com a espécie (RIKMENSPOEL; CAPUTO, 1966). Na presente pesquisa, o efeito da suplementação de açúcar na criopreservação de sêmen de catetos não pôde ser verificada porque o plasma seminal não foi retirado das amostras o que poderia interferir nos resultados.

Uma diminuição na qualidade espermática foi verificada após a descongelção para todos os tratamentos. Na verdade, a qualidade do sêmen reduz durante a criopreservação em todo o seu processo, desde a diluição, resfriamento, crioproteção, congelação, armazenamento a -196°C , até a descongelção. Durante a criopreservação, o espermatozoide sofre modificações sucessivas e adversas no volume da célula causado por alterações osmóticas durante a adição do glicerol, congelação e descongelção (HAMMERSTEDT et al., 1990). Além disso, a fluidez e as propriedades funcionais das membranas dos espermatozoides são modificadas com a diminuição da temperatura durante as fases de resfriamento e congelação, bem como durante a descongelção (BUHR et al., 1989; MAXWELL; JOHNSON, 1997), reduzindo assim a sua permeabilidade seletiva e capacidade de provocar um grande afluxo de cálcio (ROBERTSON et al., 1990; BAILEY et al., 2003). A membrana plasmática é o principal local de lesão no qual os espermatozoides criopreservados sofrem os principais danos durante a congelação e descongelção (PARKS; GRAHAM, 1992), resultando em perda substancial de espermatozoides viáveis (BAILEY et al., 2003).

Segundo Lahnsteiner, (2000) a taxa de descongelção é o parâmetro mais sensível durante a criopreservação de sêmen e deve ser feita em altas temperaturas para evitar a

recristalização. Os danos do aquecimento ocorrem quando os espermatozóides passam através da zona crítica de -50 a -15°C ou até -5°C . Da mesma forma, os espermatozóides sofrem estresse osmótico quando o tempo de descongelação é insuficiente para a saída do excesso de crioprotetores das células promovendo lise nas células devido ao derretimento abrupto do gelo extra-celular que se torna mais diluído (ANDRABI, 2007).

Alguns estudos têm demonstrado que a descongelação rápida resulta em melhores taxas de qualidade pós-descongelação, quando comparada com a descongelação lenta para o garanhão, o carneiro, o touro (WATSON, 1996), o cão (NÖTHLING; SHUTTLEWORTH, 2005) e os suínos (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000), mas essas declarações não foram confirmadas para o sêmen de catetos de acordo com nossos resultados. Sabe-se que há um patamar na relação entre a taxa de descongelação e sobrevivência de espermatozóides, indicando que o aumento da temperatura pode não melhorar a motilidade espermática (WOELDERS; MALVA, 1998). Provavelmente, ambas as taxas de descongelação testadas no presente estudo pertencem a um mesmo intervalo e não poderiam interferir na qualidade do sêmen de catetos.

Apesar de este estudo fornecer informações importantes sobre as características do sêmen congelado-descongelado de catetos, o sêmen foi somente avaliado subjetivamente. Atualmente, um sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) permite a avaliação objetiva das diferentes características das células espermáticas (por exemplo, movimento e velocidade) com um elevado grau de precisão e repetibilidade (SILVA et al., 2006). Portanto, sugere-se que novos estudos utilizando esta técnica devam ser conduzidos de modo a promover uma avaliação mais objetiva do sêmen de catetos.

O cateto é uma das espécies mais caçadas entre os vertebrados terrestres em florestas neotropicais (PERES, 1996). Em regiões semi-áridas da América do Sul, os catetos estão se tornando uma espécie adequada para programas de reprodução em cativeiro, devido à importância comercial de sua carne e da pele nas economias locais. Apesar do seu potencial econômico considerável, há poucos estudos na literatura sobre a tecnologia de sêmen dos catetos e os resultados atuais serão úteis para os bancos de genoma de recursos e tecnologias de reprodução assistida aplicadas em seu manejo. A sistemática dos bancos de recursos genômicos utilizando sêmen criopreservado no zoológico congelado oferece a oportunidade de novas estratégias de conservação de espécies ameaçadas, auxiliando no manejo genético eficaz de populações em cativeiro (JOHNSTON; LACY, 1995). O conceito de manejo

genético ex situ de pequenas populações em cativeiro de espécies ameaçadas, como o cateto, a fim de voltar a introduzi-los para a vida selvagem está a atrair cada vez mais interesse (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998).

2.6 CONCLUSÕES

Em conclusão, o sêmen de catetos coletado por eletroejaculação pode ser congelado em diluidor Tris suplementado tanto com frutose ou glicose e descongeladas pelas diferentes taxas de descongelação (37 ° C/1m ou 55 C/7s °). Estes resultados serão úteis para os bancos de recursos genéticos e tecnologias de reprodução assistida como ferramentas para aumentar o manejo de informação genética disponíveis para programas de reprodução assistida na espécie.

2.7 REFERÊNCIAS

- ANDRABI, S.M.H. Fundamental Principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. **Int J Agr Biol.**, v.9, p.367–369, 2007.
- BAILEY, J.L; MORRIER, A; CORMIER, N. Semen cryopreservation in farm species: an update. **Can J Anim Sci.**, v. 83, p.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.** v.143. p.159–168, 1998.
- BUHR, M.M; CANVIN, A.T; BAILEY, J.L. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. **Gamete Res.**, v. 23, p. 441–9, 1989.
- COSTA, D.S; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotrop.** v.5, p.1–6, 2005.

ERIKSSON, B.M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-straws. **Anim Reprod Sci.**, v. 63,p. 205–220, 2000.

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

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

HELLGREEN, E.C.; LOCHMILLER, M.S.; AMOSS, J.R.; GRANT, W.E. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*), **J Reprod Fertil.**, v. 85, p.677–686, 1989.

HU, J.H; LI, Q.W; LI, G; JIANG, Z.L; BU, S.H; YANG, H; WANG, L.Q. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality **Anim Reprod Sci.**, v. 112, p. 107–118, 2009.

JOHNSTON, L.A, LACY, R.C. Genome resource banking for species conservation selection of sperm donors. **Cryobiology.** v.32. p.68–77, 1995.

LAHNSTEINER, F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. **Aquac Res.**, v. 31, p.245–258, 2000.

MANN, T. Biochemistry of semen. In: Greep RO, Astwood EB (ed): Handbook of Physiology. Washington DC, American Physiology Society. Section 67, vol.5, p. 321–347, 1975.

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

MAYOR, P.; GALVEZ, H.; GUIMARÃES, A.G.; LOPEZ-GATIUS, F.; LOPEZ-BEJAR, M. Serum estradiol-17 β , vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. **Anim Reprod Sci.**, v. 97, p. 165–174, 2007.

NÖTHLING, J.O; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1469–1480, 2005.

ORR RT. Biologia dos Vertebrados. Roca, 1986. 508 p.

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

PAULENZ, H; SÖDERQUIST, L; ÅDNØY, T; NORDSTOGA, A; GULBRANDSEN, B; BERG, K.A. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. **Theriogenology**, v. 61, p. 1719–1727, 2004.

PERES, C.A. Population status of white-lipped *Tayassu pecary* and collared peccaries *T. tajacu* in hunted and unhunted amazonian forests. **Biol Conserv.** v.77, p.115-123, 1996.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1498–1517, 2004.

PUKAZHENTHI, B; WILDT, D.E. Which reproduction technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reprod Fertil Dev.**, v. 16, p. 33–46, 2004.

QUINTELA, A.T; GUSMÃO, A.L; LOPES, M.D; SILVA, J.C; ALVARENGA, M.A; RESENDE, J. Hyposmotic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. **In:** Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction. Belo Horizonte, 2004. p. 518 [abstract].

RIKMENSPOEL, R; CAPUTO, R. The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinases in bull spermatozoa. **J Reprod Fertil.**, v. 12 p. 437–444, 1966.

ROBERTSON, L; BAILEY, J.L; BUHR, M.M. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. **Mol Reprod Dev.**, v. 26, p. 143–9, 1990.

ROTA, A; STRÖM, B; LINDE-FORSBERG, C; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v. 47, p. 1093–1101, 1997.

SALAMON, S; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (review). **Anim Reprod Sci.**, v. 37, p.185–24, 1995.

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.

SILVA, A.R; MORATO, R.G; SILVA, L.D.M. The potential of gamete recovery from non-domestic canid and felids. **Anim Reprod Sci.**, v. 81, p. 159–175, 2004

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**, v. 66, p. 456–62, 2006.

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.

SOUSA, 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 eletroejaculation. **Anim Reprod Sci.**, v. 116, p.370–375, 2009.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reprod Dom Anim.**, v. 31, p. 135–140, 1996.

WOELDERS, H; MALVA, A.P. How important is the cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration. **Reprod Dom Anim.** v. 33, p. 299–305, 1998.

3 CAPÍTULO 3 – EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E DE DILUENTES À BASE DE TRIS SOBRE OS PADRÕES CINEMÁTICOS DE MOTILIDADE NO SÊMEN CONGELADO-DESCONGELADO DE CATETOS (*Tauassu tajacu*)

3.1 RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da centrifugação para remoção do plasma seminal e da suplementação de frutose e glicose em diluente Tris sobre os padrões cinemáticos de motilidade e outras características do sêmen congelado-descongelado de catetos em cativeiro. O sêmen de 13 catetos foram coletados por eletroejaculação e avaliados para motilidade, vigor, viabilidade espermática, integridade da membrana e morfologia dos espermatozóides. As amostras foram divididas em quatro alíquotas: duas foram mantidas *in nature* e as outras duas foram submetidas à centrifugação. As amostras de sêmen foram diluídas em diluente à base de Tris suplementados com frutose ou glicose. Gema de ovo (20%) e glicerol (3%) foram adicionados para todas as amostras que foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C/1min. O sêmen congelado e descongelado foram avaliados para os mesmos parâmetros descritos para o sêmen fresco, porém os parâmetros cinemáticos de motilidade foram avaliados por um sistema de análise computadorizada. Após a descongelação valores de motilidade total foram em média de 30% para todas as amostras. O efeito negativo da centrifugação foi verificado para morfologia espermática, linearidade, progressividade e frequência de batimento cruzado ($P<0,05$). Entretanto, não foram verificadas diferenças entre os açúcares para nenhuma amostra ($P>0,05$). Em conclusão, não é recomendado centrifugar o ejaculado de catetos antes dos procedimentos de congelação-descongelação, para o qual pode ser utilizado um diluente à base de Tris suplementado, tanto com frutose ou glicose.

Palavras-Chave: sêmen cateto, criopreservação, centrifugação, CASA

3.2 INTRODUÇÃO

Apesar dos catetos (*Tayassu tajacu*) serem semelhantes aos porcos doméstico, eles não pertencem a família siudae. Esses animais são membros da família Tayassuidae e abitam desertos savanas áridas e florestas desde os Estados Unidos até a Argentina (ORR, 1986). Eles estão constantemente sofrendo ameaça pelo desmatamento e caça predatória. Por que nos países da América latina o comércio da carne e da pele dessa espécie é importante para economia local, *T. tajacu* tem sido considerado uma espécie adequada para inclusão em programa de criação em cativeiro (BODMER, et al., 1997), porém práticas de manejo apropriada ainda não tem sido desenvolvidas para eles. (MAYOR et al., 2007). Tecnologia de sêmen para esses animais são restritas para o estabelecimento de protocolos de coleta e avaliação (HELLGREEN et al., 1989; SOUSA et al., 2009) e nenhuma informação a respeito da criopreservação foi avaliada.

Os benefícios de um banco de sêmen são bem reconhecidos (HOLT et al., 2001), e o sêmen criopreservado é uma excelente forma para armazenar valiosos materiais genéticos (JOHNSON et al., 2000). Uma intensa investigação é necessária para o desenvolvimento de métodos de preservação confiáveis em animais selvagens. Essa investigação precisa ter ênfase nas variações espécie-específicas encontradas na fisiologia celular dos espermatozoides, bem como sobre as transformações específicas que gametas sofrem durante a refrigeração, congelamento e descongelamento (FICKEL et al., 2007).

Em suínos, a presença do plasma seminal durante a criopreservação do sêmen é controversa. Pursel et al (1972) relatam que o plasma seminal torna os espermatozoides desta espécie mais sensíveis ao choque térmico, porém, Strzezek et al. (1999) descobriram que o plasma seminal é constituído por alguns antioxidantes que protegem os espermatozoides contra danos oxidativos durante a conservação. Além disso, Matas et al. (2007) concluíram que o processo de centrifugação realizado para a lavagem de sêmen pode promover danos estruturais irreversíveis aos espermatozoides.

Espermatozoides de mamíferos requerem substratos exógenos para uma variedade de funções, por exemplo, para preservar as reservas de energia intracelular, os componentes celulares, e principalmente, para apoiar a motilidade (YILDIZ et al., 2000). A frutose é pensada por ser uma importante fonte de energia para os espermatozoides do ejaculado, e

junto com a glicose, é encontrada no plasma seminal em muitas espécies de mamíferos (PONGLOWHAPAN et al., 2004). Frutose e glicose são atualmente adicionados a diluentes à base de Tris para a criopreservação de sêmen de diferentes espécies de mamíferos (SILVA et al., 2002; HU et al., 2009). Para catetos, há uma falta de informação sobre o efeito da suplementação de açúcar no diluidor sobre os parâmetros do sêmen.

Apenas poucos estudos foram realizados a fim de descrever características do sêmen de catetos (HELLGREEN et al., 1997, SOUSA et al., 2009), e eles são limitados a análises subjetivas. Hoje em dia, é bem sabido que o desenvolvimento de sistema de análise de sêmen assistida por computador (CASA) tem proporcionado um meio de obter grandes quantidades de informação objetiva das características cinemáticas de uma amostra de sêmen (SILVA et al., 2006). O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da centrifugação para remoção do plasma seminal e da suplementação de frutose ou glicose em diluidor Tris sobre os padrões cinemáticos de motilidade e outras características do sêmen congelado, descongelado obtidos a partir de catetos em cativeiro.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais experimentais

Treze catetos machos sexualmente maduros, com uma média de idade e peso de $40,7 \pm 1,6$ meses e $22,5 \pm 2,8$ kg, respectivamente, foram utilizados. Os animais pertenciam ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no nordeste do Brasil (Mossoró, RN, Brasil, $5^{\circ} 10'S$, $37^{\circ} 10'W$). O clima é tipicamente semi-árido com uma temperatura média anual de $27^{\circ} C$. Os animais foram isolados das fêmeas 6 meses antes do início do estudo e mantidos sob fotoperíodo natural de 12 h. Eles foram mantidos ao ar livre, em grupos de seis animais em piquetes ($20m \times 3m$), com uma área coberta ($3m \times 3m$). Os animais foram alimentados com ração e frutas. A água era de acesso livre.

3.3.2 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum por 12 h antes do início do experimento. Em seguida, foram contidos fisicamente usando um puçá e anestesiados com propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) com 5 mg/kg em bolus (SOUSA et al., 2009). Quando o animal apresentou sinais de despertar, 1/4 da respectiva dosagem foi administrada para manter o animal em um estado anestésico ideal. Durante o procedimento, um cateter foi inserido na veia cefálica para fluidoterapia (solução salina fisiológica a 0,9%), e os parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca e respiratória, além da temperatura retal foram monitorados.

3.3.3 Coleta de sêmen

Os animais foram mantidos em decúbito lateral, e o sêmen foi coletado usando um eletroejaculador (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brasil), ligado a uma fonte de 12-V. O ciclo de estimulação era composto por 10 estímulos em cada tensão, a partir de 5 V, seguido por um aumento de tensão em sequência de 1 V até 12 V. Os estímulos foram mantidos por uma duração de 10 min a partir do início do procedimento. A sonda do eletroejaculador media 15 cm x 1,3cm, e 12cm desta foram inseridos no reto do macho. O sêmen foi coletado em tubos plásticos e imediatamente avaliado.

3.3.4 Avaliação seminal

O volume do sêmen foi mensurado por micropipetas. A cor do sêmen foi anotada, e seu pH foi determinado usando fitas indicadoras de pH (Neutralit®, da Merck, Bucarest, Romênia). A motilidade (%) e o vigor espermático (0-5) foram avaliados imediatamente sob microscopia de luz em aumentos de 100× 400×. Esfregaços de Rosa Bengala foram preparados com 5 µl de sêmen para avaliar a morfologia espermática e a integridade acrossomal utilizando microscopia de luz (1000 ×), sendo contadas 200 células por lâmina. Os defeitos morfológicos detectados nas células espermáticas foram classificados como primários ou secundários. A porcentagem de espermatozóides vivos foi estabelecida através

da análise de uma lâmina corada com azul de bromofenol sob microscopia de luz (400 ×), sendo realizada a contagem de 200 células por lâmina. Após avaliação inicial, uma alíquota de 10-μL de sêmen foi diluída em solução salina formolizada a 10% (2 ml) e a concentração espermática (espermatozoides × 10⁶ ml⁻¹) foi determinada utilizando uma câmara de contagem de Neubauer. A integridade funcional da membrana espermática foi avaliada por um teste hiposmótico utilizando água destilada (0 mOsm / l) como a solução hiposmótica (QUINTELA et al., 2004). Uma alíquota de 0,01 mL de sêmen foi diluída em 0,09 ml de solução hiposmótica e mantidas em banho-maria à 38°C. Após 45 min, uma alíquota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina de vidro, coberta por uma lamínula, e avaliada por microscopia de contraste de fase (400 ×), nesse processo 200 células foram avaliadas. Espermatozóides que apresentaram edamaciação e caudas enroladas foram considerados como tendo a membrana espermática funcional.

3.3.5 Diluentes

Os reagentes utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). O diluente (BTS) foi utilizado para a lavagem de sêmen antes da congelação. Esta solução consistiu de 37,0 g de glicose, 6 g de citrato de sódio, 1,25 g bicarbonato de sódio, 1,25 g de EDTA, 0,75 g de cloreto de potássio, 1 g Penicilina G sódica e 1 g de Dihidroestreomicina em 1 L de água ultra pura, (WOELDEERS, 1992). Para a criopreservação, dois diluentes padronizados para outras espécies, foram testados neste estudo. O primeiro consiste em 3,028 g de Tris-hidroximetil-aminometano (Tris), 1,78 g de ácido cítrico monoidratado, e 1,25 g de D-frutose dissolvidas em 100 mL de água ultrapura foi utilizado (HU et al., 2009). O outro diluente era constituído por 2,4 g de Tris, 1,4 g de ácido cítrico monoidratado, e 0,8 g de glicose dissolvida em 100 mL de água ultra pura (ROTA et al., 1997). A osmolaridade dos diluentes foi 295 mOsm/L, e o pH foi 6,6. Vinte por cento de ambas as soluções foram, então, substituídas por gema de ovo (v/v).

3.3.6. Sêmen centrifugado e diluição inicial

Imediatamente após a coleta e avaliação inicial, as amostras de sêmen foram divididas em quatro alíquotas. Duas alíquotas foram centrifugadas a 3000 rpm/3 min . O sobrenadante foi descartado e o sedimento diluído em Tris-glicose ou Tris-frutose ambos com 20% de gema de ovo. As outras duas amostras não centrifugadas foram diretamente diluídas em Tris-frutose ou Tris-glicose acrescidas de gema de ovo na temperatura ambiente (27°C). A motilidade e o vigor espermático foram avaliados neste momento.

3.3.7 Procedimentos de congelação e descongelação

Todas as amostras foram equilibradas por 240 minutos para atingir 5°C em uma geladeira. Após o resfriamento, o sêmen foi novamente diluído em Tris-gema de ovo acrescido de 6% de glicerol (também a 5 ° C), resultando em uma concentração final de 3% de glicerol no diluente (Tris-frutose ou Tris-glicose). A diluição final resultou em uma concentração espermática de 100×10^6 espermatozoides/mL. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados após a adição de glicerol. As amostras foram acondicionadas em palhetas plásticas de 0,25 mL, que foram colocadas horizontalmente em uma caixa térmica por 20 min, 3 cm acima do nível do nitrogênio líquido (N₂). Finalmente, as palhetas foram mergulhadas em N₂ líquido para armazenamento (SELLÉS et al., 2003)

Depois de um mês, as amostras foram transportadas para o Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (NIB-UECE), na cidade de Fortaleza, Brasil. As amostras foram descongeladas por imersão das palhetas em banho-maria a 37 ° C por um min. O sêmen foi imediatamente avaliado para motilidade, vigor, porcentagem de células vivas, morfologia, integridade acrossomal e HOST, como relatado para sêmen fresco.

3.3.8 Análise de sêmen assistida por computador

As amostras foram também avaliadas pelo CASA, em conformidade com as recomendações de Iguer-Ouada e Verstegen, (2001). As amostras de sêmen (10 µL) foram colocadas em uma câmara de Makler, deixadas em repouso por 1 min, mantidas a 37° C, e examinadas em um microscópio de contrastes de fase com iluminação estroboscópica acoplado a uma câmera de vídeo adaptada ao *Sperm Class Analyzer* (SCA versão 3.2.0; Microptic SL, Barcelona, Espanha). As configurações do instrumento foram: temperatura, 37 °C; taxa de quadros, 25 quadros / seg; contraste mínimo, 75; limiar de retidão, de 45%. Três campos não consecutivos foram randomicamente selecionados. Os parâmetros analisados foram: número de células contadas, motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade média da trajetória (VAP; mm/s), velocidade linear progressiva (VSL; mm/s), velocidade curvilínea (VCL; mm/s), amplitude lateral da cabeça (ALH; mm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz), índice de progressão (STR; %) e índice de linearidade (LIN; %). Ainda a população total de espermatozóides foi subdividida em quatro categorias: rápida, com VAP superior ao limiar do VAP médio; médio, com VAP entre o limiar do VAP baixo e o médio; lento, com VAP inferior ao limiar do VAP baixo e estático, a proporção de células que não estavam se movendo (SILVA et al., 2006).

3.3.9 Análise estatística

Doze repetições foram realizadas para cada tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade pelo teste de Levene usando o procedimento univariado do Statistical Analysis System (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Para avaliar o efeito de diferentes fatores e suas interações sobre as variáveis consideradas no estudo, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento General Linear Model (GLM). Comparação entre os diferentes tratamentos sobre os parâmetros do sêmen foram analisados pelo teste de Tukey. Para todas as análises estatísticas, a significância foi estabelecida e $P < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Sêmen fresco e diluído

Quatorze ejaculados foram obtidos de 13 animais, mas dois deles não foram usados no experimento devido ao baixo volume. As médias e erro padrão das características para o sêmen fresco (n = 12 amostras) foi de $3,7 \pm 0,5$ ml de volume, com uma concentração de $506 \pm 58,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL, motilidade progressiva $93,6 \pm 1,6\%$, $3,7 \pm 0,3$ de vigor, $92,6 \pm 2\%$ de espermatozoides vivos, $49,6 \pm 2,8\%$ de células com morfologia normal, e $66,2 \pm 6,1\%$, dos espermatozoides com integridade da membrana funcional.

Não foi verificado o efeito da centrifugação sobre os parâmetros de motilidade e vigor imediatamente após a adição dos diluentes suplementados com glicose ou frutose à temperatura ambiente (Tabela 4). No entanto, após a glicerolização a 5°C , uma redução na motilidade e vigor foi verificada para todas as amostras ($P < 0,05$), onde o primeiro parâmetro foi melhor preservado ($P < 0,05$) nas amostras não-centrifugadas (tabela 4).

Tabela 4: Média $\pm$ E.P dos valores de motilidade e vigor antes e após a adição do crioprotetor (CRIOP) a (5°C) nas amostras diluídas com Tris glicose (GLI) e Tris frutose (FRUT), submetidas ou não ao processo de centrifugação (CC; SC).

	Motilidade	Vigor
GLI_SC	$88,8 \pm 2,4^a$	$3,8 \pm 0,2^a$
GLI_CC	$83,8 \pm 2,4^a$	$3,7 \pm 0,2^a$
FRUT_SC	$88,9 \pm 2,4^a$	$4,1 \pm 0,2^a$
FRUT_CC	$84,3 \pm 2,4^a$	$3,6 \pm 0,2^a$
GLI_SC_CRIOP	$66,9 \pm 2,4^b$	$2,2 \pm 0,2^b$
GLI_CC_CRIOP	$46,7 \pm 2,4^c$	$1,7 \pm 0,2^b$
FRUT_SC_CRIOP	$58,7 \pm 2,4^b$	$2,1 \pm 0,2^b$
FRUT_CC_CRIOP	$42,7 \pm 2,4^c$	$1,5 \pm 0,2^b$

^{a,b} Na mesma coluna, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ($P < 0,05$).

3.4.2 Características do sêmen pós- descongelção

De acordo com a tabela 5, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para todas as características seminais avaliadas imediatamente após a descongelção, porém as amostras centrifugadas para ambos os diluentes apresentaram uma maior incidência de alterações morfológicas totais e secundárias ($P < 0,05$). Com relação aos parâmetros cinemáticos, LIN, STR e BCF foram melhores ($P < 0,05$) preservados nas amostras não-centrifugadas para ambos os diluentes (Tabela 6). Além disso, nenhum efeito significativo nos tratamentos com relação às subpopulações espermáticas foi verificado (Tabela 7).

Tabela 5: Valores de média $\pm$ E.P das avaliações seminais realizadas imediatamente após a descongelção para o sêmen de cateto submetido à centrifugação (CC) ou não (SC), congelados com Tris glicose (GLI) e Tris frutose (FRUT).

	GLI_CC	GLI_SC	FRUT_CC	FRUT_SC
Motilidade	22,6 $\pm$ 2,3	21,7 $\pm$ 2,3	28,8 $\pm$ 2,3	22,3 $\pm$ 2,3
Vigor	2,8 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2
Vivos	47,3 $\pm$ 2,0	40,8 $\pm$ 2,1	47,2 $\pm$ 2,0	47,9 $\pm$ 2,0
Host	37,4 $\pm$ 3,7	44,6 $\pm$ 3,7	43,6 $\pm$ 3,7	42,1 $\pm$ 3,7
Normais	31,9 $\pm$ 3,6 ^b	46,2 $\pm$ 3,6 ^a	34,1 $\pm$ 3,6 ^b	47,8 $\pm$ 3,6 ^a
Alterações totais	68,1 $\pm$ 3,6 ^a	53,8 $\pm$ 3,6 ^b	65,9 $\pm$ 3,6 ^a	52,2 $\pm$ 3,6 ^b
Alt. Primarias	0,8 $\pm$ 0,4 ^b	3,4 $\pm$ 0,4 ^a	1,1 $\pm$ 0,4 ^b	2,7 $\pm$ 0,4 ^a
Alt. Secundarias	67,3 $\pm$ 3,7 ^a	50,4 $\pm$ 3,7 ^b	64,8 $\pm$ 3,7 ^a	49,5 $\pm$ 3,7 ^b
Acrossoama integro	99,7 $\pm$ 0,1	99,0 $\pm$ 0,1	99,4 $\pm$ 0,1	99,0 $\pm$ 0,1
Acrossoma não integro	0,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1

^{a,b} Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ($P < 0,05$).

Tabela 6: Valores de média $\pm$ E.P dos parâmetros de motilidade realizado por análise computadorizada no sêmen de catetos submetido a diferentes tratamentos.

	Glicose com centrifugação	Glicose sem centrifugação	Frutose com centrifugação	Frutose sem centrifugação
Nº de células contadas	563,1 $\pm$ 123,3	481,8 $\pm$ 94,4	366,6 $\pm$ 68,8	541,1 $\pm$ 115,9
Motilidade total	34,2 $\pm$ 4,8	31,5 $\pm$ 5,1	37,6 $\pm$ 5,2	35,2 $\pm$ 6,0
Motilidade progressiva	11,6 $\pm$ 2,3	12,5 $\pm$ 3,0	14,4 $\pm$ 2,9	13,6 $\pm$ 2,5
Velocidade progressiva (VSL)	9,3 $\pm$ 0,6	11,3 $\pm$ 0,9	9,6 $\pm$ 0,8	10,1 $\pm$ 1,1
Velocidade curvilínea (VCL)	29,8 $\pm$ 1,9	33,1 $\pm$ 2,5	32,8 $\pm$ 1,5	30,7 $\pm$ 2,7
Velocidade média de trajetória (VAP)	16,1 $\pm$ 0,9	18,2 $\pm$ 1,2	16,9 $\pm$ 0,9	16,4 $\pm$ 1,5
Índice de Linearidade	30,5 $\pm$ 1,0 ^b	33,3 $\pm$ 1,8 ^a	28,9 $\pm$ 1,5 ^b	32,6 $\pm$ 0,9 ^a
Índice de progressão (STR)	57,4 $\pm$ 1,2 ^b	61,7 $\pm$ 1,5 ^a	55,9 $\pm$ 1,9 ^b	61,1 $\pm$ 1,3 ^a
Amplitude lateral de cabeça (ALH)	2,5 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2
Freq. de batimento de cruzado (BCF)	4,0 $\pm$ 0,5 ^b	5,3 $\pm$ 0,7 ^a	4,7 $\pm$ 0,5 ^b	5,3 $\pm$ 0,5 ^a

^{a,b} Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ($P < 0,05$).

Tabela 7: Média $\pm$ E.P das Subpopulações espermáticas no sêmen congelado-descongelado de catetos para os diferentes tratamentos.

Categorias de espermatozóides	Glicose com centrifugação	Glicose sem centrifugação	Frutose com centrifugação	Frutose sem centrifugação
Velocidade rápida	6,7 $\pm$ 1,5	7,7 $\pm$ 2,2	10,0 $\pm$ 2,1	8,0 $\pm$ 2,0
Velocidade média	9,5 $\pm$ 1,7	8,5 $\pm$ 1,6	11,0 $\pm$ 1,8	10,7 $\pm$ 1,4
Velocidade lenta	17,3 $\pm$ 2,1	15,2 $\pm$ 1,9	16,6 $\pm$ 1,9	18,3 $\pm$ 2,6
Estáticos	66,4 $\pm$ 5,0	68,4 $\pm$ 5,1	62,4 $\pm$ 5,2	63,0 $\pm$ 5,2

^{a,b} Na mesma linha, as médias sem letras sobrescritas iguais diferem ($P < 0,05$).

3.5 DISCUSSÃO

O conhecimento da biologia reprodutiva é de suma importância para otimizar o desempenho zootécnico dos catetos em cativeiro mas como a informação sobre estes aspectos é inadequado, as práticas de manejo adequadas ainda não foram desenvolvidas para esta espécie (MAYOR et al., 2007). Neste contexto, o desenvolvimento de protocolos para a criopreservação de sêmen pode ser utilizado para minimizar a endogamia e deriva genética em pequenas populações e também preservar a diversidade genética (MADEDDU et al., 2009) desta espécie.

Nós demonstramos claramente que o processo de centrifugação reduz a motilidade e aumenta os defeitos morfológicos, antes e após o congelamento e descongelamento do sêmen de catetos adultos. Resultados semelhantes também foram encontrados para suínos, em que o processo de centrifugação promove choques mecânicos, mudanças estruturais no acrossoma e perdas substanciais na motilidade espermática (MATAS et al., 2007). Em ratos (CARDULLO; CONE, 1986), seres humanos (NG et al, 1990; AGARWAL et al, 1994), e camundongos (SCHREUDERS et al, 1996), os espermatozóides têm se mostrado muito sensível às forças mecânicas e centrífuga e deve ser manipulado sob condições cuidadosamente definidas para reduzir os danos aos espermatozoides. Por outro lado, espermatozóides de eqüinos (PICKET et al, 1975) e bovinos (CROCKETT et al, 2001), são um pouco menos sensível a centrifugação, o que indica que a especificidade das espécies é muito importante com relação à lesão espermáticas causada por centrifugação. De acordo com nossos resultados, os espermatozóides de catetos também parecem ser sensíveis ao processo de centrifugação.

Em geral, a centrifugação é realizada previamente ao processo de congelação, a fim de retirar o plasma seminal. Vários autores relatam que a sobrevivência e motilidade dos espermatozóides aumentam com a remoção do plasma seminal, e uma série de proteínas plasmáticas foram identificadas como causa de sobrevivência reduzida e perda de motilidade seminal em suínos (STRZEZEK et al., 1992), bovinos (WISHWANATH et al., 1992), caprinos (PELLICER-RUBIO et al., 1998), cavalo e (CARVER; BALL, 2002). Estas proteínas fazem contato com os espermatozóides durante a ejaculação, interagem com a membrana dos espermatozóides e influenciam características diferentes, incluindo a

motilidade (MIRÓ et al., 2009). Investigações relativas à composição do plasma seminal em catetos devem ser conduzida.

Ao melhor de nosso conhecimento, este estudo apresenta dados originais sobre o efeito similar da suplementação com frutose ou com glicose no diluidor sobre características do sêmen de catetos. A avaliação deste efeito foi possível, principalmente após a remoção do plasma seminal, pois é sabido que este líquido contém também frutose e glicose, como os açúcares principais em diferentes espécies de mamíferos (PONGLOWHAPAN et al., 2004). Resultados semelhantes foram relatados para espermatozoides caninos que são capazes de usar frutose e glicose, embora a formação de intermediários metabólicos, como a glicose-6-fosfato e ATP seja muito diferente entre as duas hexoses (RIGAU et al., 2000). Segundo Mann (1975), os espermatozoides de mamíferos podem obter energia através da glicólise e do ciclo de Krebs por consumo de monossacarídeos, como a glicose, frutose e manose; apesar de todas as espécies pode usar a maioria dos monossacarídeos, a forma específica do metabolismo varia com a espécie (RIKMENSPOEL; CAPUTO, 1966). Sabe-se que os açúcares apresentam propriedades crioprotetoras extracelular, mas essa capacidade do açúcar nas células espermática pode variar de acordo com a temperatura de armazenamento, do peso molecular do açúcar e do tipo de solução utilizada (MOLINA et al., 1994).

Estudos usando diferentes açúcares para criopreservação de sêmen suíno informou que diluidores contendo rafinose e lactose forneceu melhores taxas de sobrevivência após a congelção em diluidores contendo glicose ou frutose, indicando que o açúcar lactose com maior peso molecular melhora os parâmetros seminais pós-descongelção (DE MERCADO et al., 2010). Novos estudos devem também examinar o efeito de outros açúcares sobre os parâmetros de sêmen de catetos, a fim de melhorar a eficiência dos processos de congelção e descongelção.

O CASA tem sido utilizado para avaliar os parâmetros de motilidade espermática em várias espécies, incluindo a suína (VIZCARRA; FORD, 2006), mas nenhuma informação sobre seu uso no sêmen de catetos esta disponível. Demonstrou-se pela primeira vez os padrões de motilidade avaliada objetivamente pelo CASA no sêmen descongelado desta espécie e confirmou-se que a motilidade dos espermatozoides em uma amostra de sêmen de catetos não é uniforme, mas podem ser categorizadas em subpopulações distintas. Nossos resultados também mostraram que os padrões de motilidade, como LIN, STR e BCF foram afetados negativamente pelo processo de centrifugação.

Segundo Cox et al. (2006), a LIN está correlacionada com a eficiência de migração *in vitro* do sêmen caprino, onde os espermatozóides que apresentam valores de LIN > 50% apresentaram melhor migração. Vários autores (MORTIMER, 2000; PEÑA et al. 2000) demonstraram que valores elevados para LIN estão correlacionados a hiperativação do espermatozóide, no entanto, Verstegen et al. (2002) sugeriram que as células com LIN > 50 a 60%, que foram por muito tempo consideradas como células com hiperatividade em transição, agora acredita-se serem falsas células hiperativadas. No presente estudo, os valores inferiores a 50% foram encontrados para todos os tratamentos, mas os valores ideais para LIN do sêmen de catetos ainda são desconhecidos.

O BCF é um valor útil na estimativa das alterações microscópicas no padrão do batimento flagelar, mas pode ser dificultada pelo número de observações que podem ser feitas por segundo no CASA. Se houver mais batidas por segundo do que imagens por segundo, então o BCF será subestimado (MORTIMER; SWAN, 1999). Além disso, STR fornece a estimativa da proximidade do caminho da célula em uma linha reta com 100% correspondente à linearidade ideal (VERSTEGEN et al., 2002). O STR reflete a porcentagem de espermatozóides progressivos que indica a progressão dos espermatozóides (VSL). Ambos VSL e BCF foram demonstrados por afetar diretamente as interações entre os espermatozóides e ovócitos em cães (SILVA et al., 2006). Nos catetos, ao nosso conhecimento, não existe ainda nenhum estudo sobre as correlações entre os padrões de motilidade e a fecundação.

A motilidade dos espermatozóides é o fator mais amplamente usado como indicador da função espermática (LOPES et al., 2009). No presente estudo, os valores para motilidade espermática total do tratamento não submetido à centrifugação variou entre 2,8 e 73,4%, com média de $35,2 \pm 6,0\%$ e $31,5 \pm 5,1\%$ para Tris-frutose e Tris-glicose, respectivamente. Estes resultados foram obtidos a partir da utilização de um protocolo de congelamento-descongelamento descrito anteriormente para o sêmen suíno (SELLÉS et al., 2003).

Apesar da importância de nossos resultados, podemos admitir que os protocolos para a criopreservação de sêmen de catetos precisam ser melhorados. Por esta razão, sugerimos que mais estudos para avaliar diferentes diluidores e crioprotetores, e também as taxas de congelamento e descongelamento, utilizando outras técnicas para avaliação do sêmen, tais como corantes fluorescentes, ensaios de interação espermatozóide-ovócito e testes *in vivo* sejam realizados.

3.6 CONCLUSÕES

Em conclusão, é desaconselhável centrifugar o ejaculado de catetos antes dos procedimentos de congelação-descongelação, nos quais pode-se utilizar um diluente a base de Tris suplementado tanto com frutose ou glicose.

3.7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K.R. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. **Arch Androl.**, v. 33, p. 157–162, 1994.
- BODMER, R.E.; PUERTAS, P.; AQUINO, R.; REYES, C.; FANG, T.; GOTTDENKER, N. Manejo y uso sustentable de peccaries em La Amazonia Peruana. **Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission**. N.18, 1997.
- CARDULLO, R.A.; CONE, R.A. Mechanical immobilization of rat sperm does not exchange their oxygen consumption rate. **Biol Reprod.**, v. 34, p. 820–830, 1986.
- CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v.58, p.1587–95, 2002.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology.**, v. 66, p. 860-867, 2006.
- CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling on equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v. 55, p. 793–803, 2001.
- DE MERCADO, E.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ, E.; SANZ, E. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. **Anim Reprod Sci.**, v. 118, p.54-61, 2010.
- FICKEL, L; WAGENER, A; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Eur J Wildl Res.**, v. 53, p. 81–89, 2007.

HELLGREEN, E.C.; LOCHMILLER, M.S.; AMOSS, J.R.; GRANT, W.E. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*), **J Reprod Fertil.**, v. 85, p.677–686, 1989.

HOLT, W.V. Germplasm cryopreservation in elephants and wild ungulates. **In:** Watson, P.F., Holt, W.V. (Eds.), *Cryobanking the Genetic Resource, Wildlife Conservation for the Future*, 1st ed. Taylor & Francis, London, pp. 318–346, 2001.

HU, J.H.; LI, Q.W.; LI, G.; JIANG, Z. L.; BU, S. H.; YANG, H.; WANG, L.Q. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. **Animal Reproduction Science** v. 112, p. 107–118, 2009.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the “Hamilton Thorn Computer-Based Automated System” for dog semen analysis. **Theriogenology**, v. 55, p. 733–49, 2001

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.

LOPES, K.R.F.; COSTA, L.L.M.; LIMA, G.L.; SOUSA, A.L.P.; SILVA, A.R. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen **Theriogenology**, v. 72, p. 650–640, 2009.

MADEDDU, M.; BERLINGUER, F.; LEDDA, M.; LEONI, G.; SATTA, V.; SUCCU, S.; ROTTA, A.; PASCIU, V.; ZINELLO, A.; MUZZEDO, M.; CARRU, C.; NAITANA, S. Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 18, 2009

MANN, T. Biochemistry of semen. **In:** Greep RO, Astwood EB (ed): *Handbook of Physiology*. Washington DC, American Physiology Society. Section 67, vol.5, p. 321–347, 1975.

MATAS, C.; DECUADRO, G.; MARTINEZ-MIRO, S.; GADEA, J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. Short communication. **Theriogenology**, v. 67, p.1087–1091. 2007.

MAYOR, P.; GALVEZ, H.; GUIMARÃES, A.G.; LOPEZ-GATIUS, F.; LOPEZ-BEJAR, M. Serum estradiol-17 β , vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. **Anim Reprod Sci.**, v. 97, p. 165–174, 2007.

MIRO, J.; TABEMER, E.; RIVERA, M.; PENA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PENALBA, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**. v.72, p. 1017–1022, 2009.

MOLINA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reprod Nutr Dev.**, v. 34, p. 491–500, 1994

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A. Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. **Hum Reprod.** v. 14, p. 997–1004, 1999.

MORTIMER, S.T. CASA-practical aspects. **J Androl** v. 21, p. 514–524, 2000.

NG, S.C.; BONGSO, T.A.; SATHANANTHAN, H.; TOK, V.C.N.; RATNAM, S.S. Microcentrifugation of human spermatozoa: its effect on fertilization of hamster oocytes after micro-insemination spermatozoal transfer. **Hum Reprod.**, v. 5, p. 209–21, 1990.

ORR RT. *Biologia dos Vertebrados*. Roca, 1986. 508 p

PELLICER-RUBIO, M.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **J Reprod Fertil.**, v. 112, p. 95–105, 1998.

PEÑA, A; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology.** v.54, p.859–75, 2000.

PICKET, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, M.S.; PACE, M.M.; REMMENG, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil Steril.**, v. 26, p.167–173, 1975.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1498–1517, 2004.

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

QUINTELA, A.T.; GUSMÃO, A.L.; LOPES, M.D.; SILVA, J.C.; ALVARENGA, M.A.; RESENDE, J. Hypotonic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. **In:** Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction. Belo Horizonte, 2004. p. 518 [abstract].

RIGAU, T.; CAMPRUBI, M.; BADIA, J.; BALLESTER, J.; PALOMO, M. J.; RIVERA, M.; IZQUIERDO, D.; PEÑA, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Differential effects of fructose and

glucose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. **In:** Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction. Stocholm, 2000, p. 90 [abstract].

RIKMENSPOEL, R.; CAPUTO, R. The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinases in bull spermatozoa. **J Reprod Fertil.**, v. 12, p. 437–444, 1966.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v. 47, p. 1093–1101, 1997.

SCHREUDERS, P.D.; JETTON, A.E.; BAKER, J.L.; CRITSER, J.K.; MAZUR, P. Mechanical and chill sensitivity of mouse sperm. **Cryobiology**. v. 33 p. 676–677, 1996.

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.

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.

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

SOUSA, 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 eletroejaculation. **Anim Reprod Sci.**, v. 116, p.370–375, 2009.

STRZEZEK, J; KORDAN, W; KOSTYRA, H; ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of 5700Da sperm motility inhibiting factor for seminal plasma of boar. **Anim Reprod Sci.**, v. 29, p. 35–52, 1992.

STRZÈZEK, J.; ŁAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Animal Science Papers and Reports**, v. 17, p. 181–188, 1999.

VERSTEGEN, J.P.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p.149–79, 2002.

VIZCARRA, J.A.; FORD, J.J. Validation of the sperm mobility assay in boars and stallions. **Theriogenology**, v. 66, p. 1091–1097, 2006.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T.. Influence of the sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579–585, 2000

WISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. **Anim Reprod Sci.**, v. 29, p. 185–94, 1992.

WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **PIGS - Misset**, v. 8, p. 22-23, 1992.

ANEXOS

ANEXO 01 - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “INFLUENCE OF THE THAWING RATE ON THE CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM COLLARED PECCARIES (*TAYASSU TAJACU*) USING TRIS-BASED EXTENDERS” À REVISTA *THERIOGENOLOGY*

Dear Dr. Silva,

Your submission entitled "Influence of the sugar supplementation in the extender and the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*)" will be handled by Co-Editor-in-Chief John P. Kastelic, DVM, PhD.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Theriogenology.

ANEXO 02 - INFLUENCE OF THE THAWING RATE ON THE CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM COLLARED PECCARIES (*TAYASSU TAJACU*) USING TRIS-BASED EXTENDERS

Original do trabalho: Influência de diluentes suplementados com diferentes açúcares e taxa de descongelação na criopreservação do semen de catetos (*Tayassu tajacu*) Submetido para publicação na *Theriogenology*.

Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders

T.S. Castelo, F.S.B. Bezerra, A.L.P. Sousa, M.A.P. Moreira, V.V. Paula, M.F. Oliveira, A.R. Silva

Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA,
BR 110, Km 47, Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of the thawing rate on the quality of frozen-thawed semen obtained from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. Semen from 13 sexually mature collared peccaries males were collected by electroejaculation and further evaluated for motility, vigor, sperm viability, membrane integrity and sperm morphology. Semen was divided in two aliquots: the first was diluted in

Tris-fructose and the other in Tris-glucose. Egg yolk (20%) and glycerol (3%) was added to both groups. Samples were frozen in liquid nitrogen and thawed using two thawing rates (37 °C /1 min and 55 °C/7 s). No differences were verified between Tris-based extenders after extension, chilling or glycerol addition ($P > 0.05$). After thawing at 37 °C, values of $37.9 \pm 4.2\%$ and $28.5 \pm 5.1\%$ motile spermatozoa were found for samples extended in Tris-fructose and Tris-glucose, respectively; also, sperm motility of $33.8 \pm 3.7\%$ and $28.2 \pm 3.5\%$ were verified for the same extenders after thawing at 55 °C. No interactions between extenders and thawing rates were observed for any evaluated semen parameter ($P > 0.05$). In conclusion, semen from collared peccaries could be frozen in Tris-based extenders and thawed at different thawing rates (37°C/1m or 55°C/7s).

Keywords: *Tayassu tajacu*; semen; cryopreservation; extender; thawing rate.

1. Introduction

Some wild species, such as the collared peccaries (*Tayassu tajacu*), are threatened by hunting because of the great international value of their meat and pelts [1]. In this context, biotechnology has a tremendous potential as a tool that helps in the conservation of wild animals [2]. Biotechniques as artificial insemination and semen conservation that are routine in domestic species are not easily adapted to the wildlife due to lack of knowledge about anatomy, morphology and mechanisms that regulate reproductive success in wild animals [3].

Even though the collared peccaries look like pigs, they do not belong to the Suidae family. Those animals are Tayassuidae members that inhabit deserts, arid savannahs and forests from the United States to the Argentina [4]. Nowadays, there is an increase in interest on the legalized breeding of this species, but appropriate management practices have not yet

been developed for them [5]. Semen technology for those animals is restricted to the establishment of protocols for collection and evaluation [6,7], and no information regarding cryopreservation is available.

Intensive research is required for the development of reliable preservation methods in wild animals. Such research needs to emphasize on species-specific variations in cellular physiology of spermatozoa as well as the specific transformations that gametes undergo during chilling, freezing, and thawing [8]. Among the factors that are critical for freezing a semen sample, the extender also deserves consideration. Different extenders have been used for mammalian species but a perfect extender has not yet been found. However, the Tris-based diluents have become more universal, and this buffering medium combined with egg yolk and glycerol has been tested extensively for different species as bovine [9], canine [10] and swine [11].

Cryopreserved semen presents a significant reduction in viability after thawing procedures that can induce ultrastructural, biochemical and functional damage to the spermatozoa [12]. Therefore, numerous studies have been conducted in order to determine the ideal thawing rate for the semen from different animals such as boars [13], rams [14] and dogs [15]. We aimed to study the influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen obtained from collared peccaries using Tris-based extenders.

2. Materials and methods

2.1. *Animals*

Thirteen sexually mature male collared peccaries with an average age and weight of 40.7 ± 1.6 months and 22.5 ± 2.8 kg, respectively, were used. The animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals from Universidade Federal Rural do Semi-Árido, located in the northeast of Brazil (Mossoró, RN, Brazil; 5°10'S, 37°10'W). The climate is typically semi-arid with an average annual temperature of 27 °C. The animals were isolated from females 6 months before the commencement of the study and kept under a 12-h natural photoperiod. They were maintained outdoors in groups of six animals in paddocks (20 m × 30 m) with a covered area of (3 m × 3 m). The animals were fed with sow food and fruits. Water was freely available.

2.2. *Anesthesia*

Animals were fasted 12 h before the experiments began. They were then physically restrained using a hand net and anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan®, Cristalia, Fortaleza, Brazil) at 5 mg/kg in their bolus [7]. When the animal showed signs of awakening, 1/4 of the respective dosage was administered to keep the animal in an anesthetic state. 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

Animals were kept in lateral recumbence, and semen was collected by using an electroejaculator (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brazil) connected to a 12-V source. The stimulatory cycle comprised 10 stimuli in each voltage, starting from 5 V, followed by a voltage increase in steps of 1 V up to 12 V. Each electrical stimulus lasts 3s with intermittent breaks of 2s. The stimuli were maintained for a 10-min duration from the beginning of the procedure. The electroejaculator probe measured 15 cm × 1.3 cm; and 12 cm were inserted into the rectum of the male. Semen was collected into plastic tubes and immediately evaluated.

2.4. Semen evaluation

Semen volume was measured by micropipettes. The color of the semen was noted, and its pH was determined using pH-indicator strips (Neutralit®, Merck, Bucharest, Romania). Sperm motility (%) and vigor (0–5) were assessed immediately using light microscopy under 100× and 400× magnification. Bengal Rose stained smears were prepared with 5 µL of semen to evaluate sperm morphology and acrosomal integrity using light microscopy (1000×), counting 200 cells per slide. Morphologic defects detected in the sperm were classified as primary or secondary. Percentage of live spermatozoa was established by analyzing a slide stained with Brome-phenol Blue under light microscopy (400×), counting 200 cells per slide. Following initial assessment, a 10-µL semen aliquot was diluted in 10% buffered formalin (2 mL) and sperm concentration (sperm × 10⁶ mL⁻¹) was determined using a Neubauer counting chamber. Functional integrity of the sperm membrane was evaluated by a hypo-osmotic

swelling (HOS) test using distilled water (0 mOsm/L) as the hypoosmotic solution [16]. A 0.01 ml aliquot of semen was diluted in 0.09 mL hypoosmotic 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 (400×), counting 200 cells. Spermatozoa presenting swollen coiled tails were considered to have a functional sperm membrane.

2.5. Extenders

The reagents used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Two formulations for Tris-based extender largely standardized for other species were used in this study. The first formulation consisted of 3.028 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris), 1.78 g monohydrated citric acid, and 1.25 g D-fructose dissolved in 100 mL ultrapure water (Tris-fructose) [11]. The other one consisted of 2.4 g of Tris, 1.4 g monohydrated citric acid, and 0.8 g glucose dissolved in 100 mL ultrapure water (Tris-glucose) [17]. The osmolarity of extenders was 295 mOsm/L and the pH was 6.6. Twenty percent of both the solutions were then replaced by egg yolk (vol/vol).

2.6. Semen processing

Semen was initially extended in Tris-fructose or Tris-glucose plus egg yolk (20%) at room temperature (27 °C). Samples were equilibrated for 240 min in order to reach 5 °C in a refrigerator. After cooling, semen was added to Tris-egg yolk plus 6% glycerol (also at 5 °C), resulting in a final concentration of 3% glycerol in the extender. Final dilution resulted in a

sperm concentration of 100×10^6 sperm/ml. Samples were packed into 0.25 ml plastic straws, which were placed horizontally in an insulated box for 20 min, 3 cm above the liquid nitrogen (N_2) level. Finally, the straws were plunged into liquid N_2 for storage [18].

2.7. Thawing procedures

After one week, samples frozen in one or the other extender were thawed at two thawing rates. In the first case, the straws were immersed in water bath at 37 °C /1 min. In the other case, straws were immersed in water bath at 55 °C/7 s, followed for further 30 s at 37 °C. Semen was immediately evaluated for sperm motility and vigor, percentage of live cells, morphology, acrosomal integrity, and HOS test.

2.8. Statistical analysis

Twelve replicates were performed for each treatment. The results were expressed as mean $\pm$ SEM. Data were checked for normality by Shapiro-Wilk test, and for homoscedasticity by Levene's test using the univariate procedure of the Statistical Analysis System (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). To evaluate the effect of different factors (animals, extenders and thawing rates) and their interactions on the variables considered in the study, data were subjected to the analysis of variance using the General Linear Model procedure (GLM). Comparison among the different treatments on the semen parameters were analyzed by Tukey's test. For all statistical analyses, significance was established at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *Fresh and extended semen*

Twenty-one attempts for semen collection were conducted in 13 animals, but only 14 ejaculates were obtained, which denotes an efficiency of 66% for the electroejaculatory procedure. From four individuals, two ejaculates were collected at one month interval. Six other males ejaculated only in one occasion, and no sample was collected from three males. Two ejaculates were not used in the experiment because of the low volume. Other twelve ejaculates were white in color and presented an aqueous aspect and a volume of 3.7 ± 0.5 ml. Other semen characteristics are presented in table 1. A wide range was verified for all the semen characteristics.

Addition of the extenders does not affect the sperm motility and vigor, although a decrease in the values for these parameters was verified after chilling and glycerol addition (Table 2). No differences were verified between extenders supplemented with fructose or glucose after extension, chilling or glycerol addition ($P > 0.05$).

3.2. *Post-thaw sperm characteristics*

Table 3 shows that freezing-thawing procedures induced a decrease in the values for sperm motility, vigor, live sperms and functional membrane integrity when compared to fresh values ($P < 0.05$), but sperm morphology was not affected ($P > 0.05$). In addition, no interaction was observed between sugar supplementation and thawing rates for any semen parameter evaluated ($P > 0.05$).

Discussion

There is a lack of information regarding semen parameters for collared peccaries. Results for fresh semen obtained in this study are quite better than those reported in a previous research conducted by our team in which an electroejaculatory protocol that lasts only 5 min was used [7]. We believe that increasing the time from only 5 to 10 min allows us to collect samples with larger volume and sperm concentration. Despite collared peccaries are known to be very stressful and that the management always threatens them, Costa and Paula [19] collected the semen from these animals using an electroejaculation protocol that lasts 10 min and no collateral effect was verified for any animals. Based in that research, we decided to increase the time for electroejaculatory stimulation.

For the first time, we demonstrate that semen from collared peccaries could be cryopreserved using Tris-based extenders. It is well known that buffers containing zwitterions such as Tris are soluble in water but impermeable to biological membranes and also seem to be more resistant to the changes in pH during cooling procedures than other buffers. These characteristics provide that Tris-based usually promote better post-thaw sperm motility than other extenders in the preservation of semen of several mammals [20]. Particularly for collared peccaries, we emphasize that there was a lack of information regarding the mechanism of action of any other extenders which justifies further researches on this subject.

Tris-based extenders are currently supplemented both with fructose or glucose. Fructose is thought to be a major energy source for ejaculated spermatozoa, and together with glucose, it is found in seminal plasma in many mammalian species (Ponglowhapan et al., 2004). According to Mann [21], mammalian spermatozoa can obtain energy through glycolysis and the Krebs cycle by consumption of monosaccharides; although all species can

use most monosaccharides, the specific manner of metabolism varies with species [22]. In present research, the effect of the sugar supplementation on the semen cryopreservation of collared peccaries could not be checked because the seminal plasma was not withdrawn from the samples and it could interfere in the results.

A decrease on sperm quality was verified after thawing for all the treatments. In fact, semen cryopreservation describes the entire process of dilution, cooling, cryoprotection, freezing, storage at -196°C , and thawing. During cryopreservation, sperms undergo successive and opposite changes in cell volume caused by osmotic changes during glycerol addition, freezing and thawing [23]. Moreover, the fluidity and functional properties of the sperm membranes are modified as the temperature decreases during the cooling and freezing phases as well as during thawing [24,25], thus reducing their selective permeability and ultimately leading to a major influx of calcium [26,27]. The plasma membrane is the primary site of injury to cryopreserved spermatozoa and the principal damage occurs during freezing and thawing [28], resulting in substantial loss of viable spermatozoa [27].

Thawing rate is the most sensitive parameter during semen cryopreservation and should be made at high temperatures to avoid recrystallization [29]. The warming damage occurs when the spermatozoa pass through the critical zone of -50 to -15°C or up to -5°C . Likewise, spermatozoa suffer osmotic stress when the duration of thawing is insufficient for outflow of excess cryoprotectants from the cell and the spermatozoa swells and lyses as the medium becomes abruptly diluted by the melting of extracellular ice [9].

Some studies have demonstrated that fast thawing rate results in better post-thaw quality when compared with slower thawing for stallion, ram, bull [30] dog [15] and boar [13], but these statements were not confirmed for semen from collared peccaries according to our results. It is known that there is a plateau in the relation between thawing rate and sperm

survival, whereas increasing the temperature, sperm motility could not be improved further [31]. Probably, both thawing rates tested in the present study were into the same range and could not interfere in the semen quality from collared peccaries.

In spite of this study provides important information regarding frozen-thawed sperm characteristics of collared peccaries, semen was only subjectively evaluated. Currently, computer-assisted sperm analysis (CASA) enables objective assessment of various cell characteristics (e.g., motion and velocity) with a high degree of precision and repeatability [32]. Therefore, it is suggested that further studies using this technique should be conducted in order to promote a more objective evaluation of the semen from collared peccaries.

The collared peccary is one of the most hunted species among the terrestrial vertebrates in neotropical forests [33]. In semi-arid regions of South America, collared peccary is becoming a suitable species for captive breeding programs due to the importance of its meat and the pelt trade in local economies. Despite its considerable economic potential, there are few studies on literature regarding semen technology of collared peccaries and the present findings will be useful for genome resource banks and assisted reproductive technologies applied to their management. The systematic banking of genome resources using cryopreserved sperm in the frozen zoo offers the opportunity to further conservation strategies of endangered species by assisting in the effective genetic management of captive populations [34]. The concept of ex situ genetic management of small captive populations of endangered species, as the collared peccary, with a view to re-introducing them into the wild is attracting increasing interest [35].

In conclusion, we provide original information on semen cryopreservation of collared peccaries, demonstrating that semen collected by electroejaculation could be cryopreserved in Tris-based extenders and thawed at different thawing rates (37°C/1m or 55°C/7s). Further

studies regarding different extenders, cryoprotectants, and freezing-thawing rates should be conducted in order to optimize the protocols for semen conservation of this species.

Acknowledgements

The authors thank CAPES for grants and FAPERN for financial support, CEMAS/UFERSA for providing the animals used in the experiment.

References

- [1] Bodmer RE, Bendayan NY, Moya L, Fang TG. Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. Boletin de Lima 1990;70:49–56.
- [2] Silva AR, Morato RG, Silva LDM. The potential of gamete recovery from non-domestic canid and felids. Anim Reprod Sci 2004;81:159–175.
- [3] Pukazhenth B, Wildt DE. Which reproduction technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? Reprod Fertil Dev 2004; 16:33–46.
- [4] Orr RT. Biologia dos Vertebrados. Roca, 1986. 508 p.
- [5] Mayor P, Galvez H, Guimarães AG, Lopez-Gatius F, Lopez-Bejar M. Serum estradiol-17 β , vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. Anim Reprod Sci 2007;97:165–174.
- [6] Hellgreen EC, Lochmiller MS, Amoss JR, Grant WE. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*), J Reprod Fertil 1989;85:677–686.

- [7] Sousa 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.
- [8] Fickel L, Wagener A, Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. Eur J Wildl Res 2007;53:81–89.
- [9] Andrabi SMH. Fundamental Principles of Cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus Bull Spermatozoa. Int. J. Agr. Biol. 2007;9:367-9.
- [10] Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. The Veterinary Journal 2002;164:244-6.
- [11] Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Bu SH, Yang H, Wang LQ. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality Animal Reproduction Science 2009;112:107–18.
- [12] Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (review). Anim Reprod Sci 1995;37:185–24.
- [13] Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-straws. Anim Reprod Sci 2000;63:205–220.
- [14] Paulenz H, Söderquist L, Ådnøy, T, Nordstoga A, Gulbrandsen B, Berg KA. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. Theriogenology 2004;61:1719–1727.
- [15] Nöthling JO, Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. Theriogenology 2005;63:1469-1480.

- [16] Quintela AT, Gusmão AL, Lopes MD, Silva JC, Alvarenga MA, Resende J. Hyposmotic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. In: Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction. Belo Horizonte, 2004. p. 518 [abstract].
- [17] Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997;47:1093–1101.
- [18] 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* 2003;38:66–72.
- [19] Costa DS, Paula TAR. Coleta e avaliação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). *Biota Neotrop.* 2005;5:1–6.
- [20] Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2000;59:31- 41.
- [21] Mann T. Biochemistry of semen. In: Greep RO, Astwood EB (ed): *Handbook of Physiology*. Washington DC, American Physiology Society, 1975; Section67, vol.5, 321-347.
- [22] Rikmenspoel R, Caputo R. The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinases in bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1966;12:437–444.
- [23] Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990;11:73–88.
- [24] Buhr MM, Canvin AT, Bailey JL. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Res* 1989;23:441–9.

- [25] Maxwell WM, Johnson LA. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 1997;46:408–18.
- [26] Robertson L, Bailey JL, Buhr MM. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1990;26:143–9.
- [27] Bailey JL, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation in farm species: an update. *Can J Anim Sci* 2003;83:393–401.
- [28] Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992;38:209–22.
- [29] Lahnsteiner F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. *Aquac Res* 2000;31:245–258.
- [30] Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 1996;31:135–140.
- [31] Woelders H, Malva AP. How important is the cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration. *Reprod Dom Anim* 1998;33:299–305.
- [32] 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.
- [33] Peres CA. Population status of white-lipped *Tayassu pecary* and collared peccaries *T. tajacu* in hunted and unhunted amazonian forests. *Biol Conserv* 1996;77:115–123.
- [34] Johnston LA, Lacy RC. Genome resource banking for species conservation selection of sperm donors. *Cryobiology* 1995;32:68–77.

- [35] Bainbridge, DR, Jabbour HN, 1998. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. Vet. Rec. 1998;143:159–168.

Table 1

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

	Mean $\pm$ SEM	Range
Sperm concentration ($\times 10^6$)	506.6 $\pm$ 58.3	280 – 960
Sperm motility (%)	93.6 $\pm$ 1.6	80 – 100
Vigor (0-5)	3.7 $\pm$ 0.3	2 – 5
Live cells (%)	92.6 $\pm$ 2	79 – 100
Functional membrane integrity (%)	66.2 $\pm$ 6.1	31 – 92
Sperm morphology		
Normal (%)	49.6 $\pm$ 2.8	33 – 73
Primary defects (%)	2.1 $\pm$ 0.5 ^a	1 – 7
Secondary defects (%)	48.1 $\pm$ 2.0	93 – 100
Total defects (%)	50.4 $\pm$ 2.8	27 – 67
Acrosomal integrity (%)	99.7 $\pm$ 0.2	98 – 100

Table 2: Mean $\pm$ SEM for sperm motility and vigor in fresh, extended and glycerol-added semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris extender supplemented with fructose or glucose (n=12).

Semen	Extender	Motility (%)	Vigor (0 – 5)
Fresh		93.6 $\pm$ 1.6 ^a	3.7 $\pm$ 0.3 ^a
Extended	Tris-fructose	88.7 $\pm$ 2.6 ^a	3.9 $\pm$ 0.2 ^a
	Tris-glucose	90.3 $\pm$ 1.9 ^a	3.7 $\pm$ 0.3 ^a
Glycerol added	Tris-fructose	60.0 $\pm$ 4.8 ^b	2.1 $\pm$ 0.2 ^b
	Tris-glucose	67.5 $\pm$ 5.3 ^b	2.2 $\pm$ 0.2 ^b

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

Table 3: Mean $\pm$ SEM for fresh and frozen semen (n=12) from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris extender supplemented with fructose or glucose and different thawing rates.

	Fresh semen	Thawed at 37°C/1 min		Thawed at 55°C/7s	
		Tris-fructose	Tris-glucose	Tris-fructose	Tris-glucose
Sperm motility (%)	93.6 $\pm$ 1.6 ^a	37.9 $\pm$ 4.2 ^b	28.5 $\pm$ 5.1 ^b	33.8 $\pm$ 3.7 ^b	28.2 $\pm$ 3.5 ^b
Vigor (0 – 5)	3.8 $\pm$ 0.3 ^a	2.3 $\pm$ 0.2 ^b	2.4 $\pm$ 0.2 ^b	2.3 $\pm$ 0.2 ^b	2.2 $\pm$ 0.3 ^b
Live sperm (%)	92.5 $\pm$ 2.0 ^a	47.4 $\pm$ 2.6 ^b	52.3 $\pm$ 5.1 ^b	54.6 $\pm$ 3.5 ^b	53.2 $\pm$ 5.1 ^b
Functional membrane integrity (%)	66.1 $\pm$ 6.1 ^a	41.7 $\pm$ 5.3 ^b	38.4 $\pm$ 4.8 ^b	34.1 $\pm$ 4.7 ^b	31.3 $\pm$ 5.5 ^b
Sperm morphology					
Normal (%)	49.6 $\pm$ 2.8	48.7 $\pm$ 2.7	46.7 $\pm$ 2.7	53.0 $\pm$ 2.8	45.7 $\pm$ 3.0
Primary defects (%)	2.1 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.4 ^a	3.3 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.5
Secondary defects (%)	48.1 $\pm$ 2.0	48.3 $\pm$ 2.8	50.6 $\pm$ 3.1	44.3 $\pm$ 3.0	50.9 $\pm$ 3.1
Total defects (%)	50.4 $\pm$ 2.8	51.3 $\pm$ 2.7	53.3 $\pm$ 2.7	47.0 $\pm$ 2.8	54.3 $\pm$ 3.0
Acrosomal integrity	99.7 $\pm$ 0.2 ^a	99.3 $\pm$ 0.2 ^a	99.7 $\pm$ 0.2 ^a	99.4 $\pm$ 0.3 ^a	99.5 $\pm$ 0.2 ^a

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

ANEXO 03 – DESCRIÇÃO DOS MODELOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS

A) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 2

Avaliou-se, inicialmente, a condição de normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, para todas as variáveis em estudo, utilizando-se o procedimento *univariate* do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.10). Os dados que não apresentaram distribuição normal sofreram a transformação ($\sqrt{X + 100}$), para estabilizar a variância. Para realização da análise estatística, utilizou-se um modelo matemático descrito a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + Ac_i + T_j + C_k + An_l + I_{(ij)} + I_{(ijl)} + \varepsilon_{ijklm}$$

Onde: Y_{ijkl} = Valor observado das variáveis no i-ésimo açúcar, na j-ésima temperatura, na k-ésima coleta e no l-ésimo animal; μ = Média Geral; T_i = Efeito do i-ésimo tratamento ($i=1, 2$); C_j = efeito da j-ésima coleta ($j=1, 2$); $I_{(ij)}$ = efeito da interação entre o i-ésimo açúcar e a j-ésima temperatura; $I_{(ijl)}$ = Efeito da interação do o i-ésimo açúcar, j-ésima temperatura e l-ésimo animal e ε_{ijkl} = Erro aleatório associado a cada observação.

B) Modelo estatístico utilizado no experimento do Capítulo 3

Avaliou-se, inicialmente, a condição de normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, para todas as variáveis em estudo, utilizando-se o procedimento *univariate* do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.10). Os dados que não apresentaram distribuição normal sofreram a transformação ($\sqrt{X + 100}$), para estabilizar a variância. Para realização da análise estatística, utilizou-se um modelo matemático descrito a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + Ac_i + Ce_j + Co_k + An_l + I_{(ij)} + I_{(ijl)} + \varepsilon_{ijklm}$$

Onde: Y_{ijkl} = Valor observado das variáveis no i-ésimo açúcar, na j-ésima centrifugação, na k-ésima coleta e no L-ésimo animal; μ = Média Geral; T_i = Efeito do i-ésimo tratamento (i=1; 2); C_j = efeito da j-ésima centrifugação (j=1, 2,); $I_{(ij)}$ = efeito da interação entre o i-ésimo açúcar e a j-ésima centrifugação; $I_{(ijl)}$ = Efeito da interação do o i-ésimo açúcar, j-ésima temperatura e l-ésimo animal e ε_{ijkl} = Erro aleatório associado a cada observação.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) por meio do procedimento “PROC GLM” do SAS (Statistical Analysis System, versão 6.10) e quando foi observada diferença significativa entre os tratamentos pelo teste “F” ($P < 0,05$), realizou-se o teste de tukey para comparação entre as médias das diferentes variáveis.

