

## DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GEMA DE OVO EM PÓ ADICIONADA AO DILUENTE ACP-103<sup>®</sup> NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO

### *DIFFERENT CONCENTRATIONS OF POWDERED EGG YOLK ADDED TO THE ACP-103<sup>®</sup> EXTENDER IN SWINE SEMEN CONSERVATION*

Ricardo Toniolli<sup>1\*</sup>

Tatyane Bandeira Barros<sup>2</sup>

Luciana de Souza Toniolli<sup>1</sup>

Daianny Barboza Guimarães<sup>2</sup>

Eduardo Nunes de Freitas<sup>1</sup>

Thalles Gothardo Pereira Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

\*Autor para correspondência - ricardo.toniolli@uece.br

#### **Resumo**

Muitas tentativas são feitas para se melhorar a conservação do sêmen suíno, sendo a gema de ovo conhecida por suas propriedades crioprotetoras. Este trabalho teve por objetivo testar diferentes concentrações de gema de ovo em pó (GOP), adicionada ao diluente água de coco em pó (ACP-103<sup>®</sup>), e verificar qual mantém melhor a viabilidade espermática. Foram diluídos 36 ejaculados em ACP-103<sup>®</sup>, acrescidos de diferentes concentrações de GOP (0%, 1%, 3%, 5% e 7%) e conservados a 17 °C. Diariamente, foram realizadas análises de vigor e motilidade e nos dias 1 (D0), 3 (D2) e 5 (D4) de conservação foram feitas as de vitalidade, morfologia e resistência osmótica. Utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis e de Dunn's para dados não paramétricos e ANOVA e Tukey para os paramétricos. Queda de vigor e motilidade foi observada em todos os tratamentos. Os GOP-3%, GOP-5% e GOP-7% foram os que melhor mantiveram o vigor espermático em D0 (2,4±0,8; 2,5±1,1 e 2,8±0,9, respectivamente), sem diferenças significativas entre si. O mesmo ocorreu para a motilidade (77±15%, 74±23% e 81±16% em D0). Os resultados das análises de vitalidade, morfologia e resistência osmótica não diferiram. Em conclusão, as concentrações entre 5 e 7% de GOP adicionado ao ACP-103<sup>®</sup> permitem sua utilização como diluente eficiente para manter a qualidade espermática.

**Palavras-chave:** água de coco em pó; conservação; gema de ovo; sêmen suíno.

#### **Abstract**

Many attempts have been made to improve the conservation of boar semen. Egg yolk is known to have cryoprotectant properties. This study aimed to test different concentrations of egg yolk added to the coconut milk powder extender (ACP-103<sup>®</sup>), and verify which one is better to maintain sperm viability. The ejaculated (36) were diluted in ACP-103<sup>®</sup> supplemented with different concentrations of egg yolk (0%, 1%, 3%, 5% and 7%). The conservation occurred at 17 °C, and vigor and motility analysis were carried out daily. On days 1 (D0), 3 (D2) and 5 (D4) the semen was evaluated for

vitality, morphology and osmotic resistance. For statistical nonparametric analysis Kruskal-Wallis and Dunn's tests were performed, and for parametric data ANOVA and Tukey test were used. A decrease in vigor and motility was observed in all treatments. Treatments T2, T3 and T4 better maintained spermatic on D0 ( $2.4\pm 0.8$ ,  $2.5\pm 1.1$ , and  $2.8\pm 0.9$ , respectively), with no significant differences among them. The same was observed for motility ( $77\pm 15\%$ ,  $74\pm 23\%$ , and  $81\pm 16\%$  on D0). Analyses of vitality, morphology and osmotic resistance did not show statistical difference among treatments. In conclusion, the concentration of egg yolk (7%) added to the ACP-103<sup>®</sup> can be effectively used as extender to maintain sperm viability.

**Keywords:** boar semen; coconut water powder; conservation; egg yolk.

Enviado em: 23 março 2012

Aceito em: 10 outubro de 2015

## Introdução

O espermatozoide é uma célula única, o que significa que suas membranas, organelas e atividades metabólicas estão todas conectadas e, por isso, ela é altamente especializada<sup>(1)</sup>. Além disso, tem como característica a sensibilidade às alterações de temperatura<sup>(2)</sup>. O sêmen suíno é mais sensível às variações de temperatura do que o de outras espécies domésticas, por isso ele é melhor conservado em temperaturas entre 15 e 19 °C. Com o desenvolvimento dos métodos de conservação seminal, observou-se que o resfriamento é uma alternativa viável para uma preservação em curto prazo<sup>(3)</sup>, apresentando uma série de vantagens como o transporte de material genético a maiores distâncias, a redução do transporte de animais, a prevenção de doenças sexualmente transmissíveis e a criação de um banco de sêmen<sup>(4)</sup>. Entretanto, sua utilização requer avaliações adicionais dos diluentes e das condições de estocagem<sup>(5)</sup>, a fim de se evitar, por exemplo, problemas de contaminação. Por isso a necessidade da adição de antibióticos, visando a prolongar o tempo de armazenamento dos espermatozoides refrigerados<sup>(6)</sup>.

Na tentativa de se melhorar a conservação do sêmen do varrão durante o resfriamento, diversos componentes de meios diluentes têm sido testados, incluindo a gema de ovo, sendo a sua maior função a diminuição de danos à célula espermática durante processos de resfriamento e congelamento<sup>(7)</sup>. Apesar de seu mecanismo de ação ainda não ser bem compreendido, acredita-se que ela atue recobrando a superfície da membrana plasmática, estabilizando-a e ajudando a diminuir os possíveis danos celulares causados durante as curvas de resfriamento do sêmen e, aparentemente, não provocando alterações permanentes na sua composição<sup>(8)</sup>. Suas propriedades protetoras foram descobertas por Phillips em 1939<sup>(9)</sup> e, a partir de então, vêm sendo testadas na conservação e criopreservação de espermatozoides de diversas espécies animais, tais como cervos<sup>(10)</sup>, cães<sup>(11)</sup> e suínos<sup>(12)</sup>. Apesar de sua crescente utilização nos últimos anos, reforçou-se o argumento contra a sua presença na composição desses meios, em função do risco de contaminação por bactérias e pelo micoplasma<sup>(13)</sup>.

A gema de ovo é usualmente utilizada na concentração de 20%, mas estudos laboratoriais revelaram que esta concentração dificulta as avaliações metabólicas como vigor e motilidade<sup>(14)</sup>. Portanto, em virtude da necessidade do desenvolvimento de técnicas e soluções que permitam a utilização do sêmen suíno resfriado sem alterações da qualidade seminal, este estudo teve por objetivo testar diferentes concentrações de gema de ovo em pó (GOP) adicionadas ao diluente à base de água de coco em pó (ACP-103<sup>®</sup>)<sup>(15)</sup> e verificar qual delas permite uma manutenção prolongada da viabilidade espermática.

## Material e Métodos

Para o experimento, foram selecionados animais com idade entre 12 e 24 meses, utilizados em sistema rotineiro de coleta de sêmen e provenientes da granja Regina Agroindustrial S/A<sup>®</sup>, situada no município de Maranguape-Ce a 38° 40' W e 3° 54' S<sup>(16)</sup>, e do Laboratório de Reprodução Suína e

Tecnologia do Sêmen da Faculdade de Veterinária / Universidade Estadual do Ceará.

O sêmen de 11 varrões foi coletado, uma vez por semana durante 20 semanas ( $n = 36$ ), de forma que os varrões eram alternados durante as semanas. Antes de cada coleta, era realizada a higienização do prepúcio com água corrente, seguida de esgotamento prepucial por pressão manual no sentido caudocranial e secagem da região com papel toalha. Para a coleta do sêmen foi utilizado um manequim e empregada a técnica da mão enluvada, sendo o sêmen colhido em recipiente plástico provido de filtro e protegido por copo térmico aquecido a 37 °C.

Após a coleta, a fração do ejaculado livre de gel foi avaliada quanto à concentração ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL, em espectrofotômetro); volume (mL); total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz – concentração multiplicada pelo volume); vigor espermático de acordo com escala de 0 a 5<sup>(17)</sup> e percentual de espermatozoides móveis (0 a 100%). Uma amostra de sêmen de 15  $\mu$ L foi depositada entre lâmina e lamínula, previamente mantidas em placa aquecedora, e analisada ao microscópio óptico em aumento de 200x. A partir desta avaliação, foram selecionados os ejaculados que apresentavam vigor espermático  $\geq 3,5$  e motilidade  $\geq 80$  %.

Da concentração total do ejaculado foram utilizados 8  $\times 10^9$  spz, sendo incubados a 30 °C por 30 minutos, antes da diluição, então divididos em alíquotas contendo, em cada tratamento, 35  $\times 10^6$  spz/mL. O volume final por tratamento foi de 25 mL (sêmen + diluente), o qual foi fracionado em cinco tubos de ensaio plástico de 5 mL, correspondentes aos dias de incubação. De acordo com a concentração de cada ejaculado, volumes diferentes de diluente foram utilizados a fim de se completar o volume final, respeitando-se um total de 175  $\times 10^6$  spz/tubo, em 5 mL de volume final. Após a diluição, os tubos com o sêmen foram mantidos em geladeira a 17 °C durante o período de 5 dias, sendo o dia da coleta considerado dia zero (D0). Ao longo do período experimental, um tubo / ejaculado de cada tratamento foi incubado em banho-maria a 37 °C por 10 minutos para posterior análise.

O diluente utilizado foi à base de água de coco em pó (ACP-103®), obtida pela técnica do *spray dry*<sup>(18)</sup>, sendo reconstituído com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP®-103 + 100 mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80 mg/100 mL. Já a gema de ovo em pó foi obtida por processo de pasteurização e fornecida pela empresa NaturOvos®.

A diluição do ejaculado foi feita a 30 °C, acrescentando-se o diluente ao sêmen *in natura*. Desta forma, foram constituídos os tratamentos conforme as concentrações de gema de ovo em pó a serem testadas, sendo eles: (T1) GPO - 0% = ACP-103® (Controle); (T2) GOP - 1% = ACP-103® + 1% gema de ovo; (T3) GOP - 3% = ACP-103® + 3% gema de ovo; (T4) GOP - 4% = ACP-103® + 5% gema de ovo; (T5) GOP - 7% = ACP-103® + 7% gema de ovo.

Durante o período de refrigeração (D0 – após 3 horas da coleta do sêmen, D1, D2, D3 e D4, com intervalos de 24 horas), foram avaliadas as seguintes variáveis: vigor espermático; motilidade total; integridade da membrana acrossômica; porcentagem de células vivas (vitalidade) e teste de resistência osmótica, ambos descritos abaixo.

O exame da morfologia espermática foi realizado em D0, D2 e D4. Esfregaços de sêmen foram corados pela técnica de Medeiros et al.<sup>(19)</sup>, que utiliza a solução de azul de bromofenol: (0,1 g) + citrato de sódio (0,4 g) + de água destilada (10 mL). Foram medidos o pH e a osmolaridade, sendo esta ajustada entre 300 e 310 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. A solução corante foi conservada a 5 °C. Para se preparar o esfregaço homogenizou-se uma gota de sêmen e outra de corante, mantidas a 37 °C e, após 30 segundos, retirou-se uma gota dessa mistura para a confecção do esfregaço, que foi seco à temperatura ambiente. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina, por meio de microscopia óptica com objetiva de imersão, a um aumento de 100x. As análises foram divididas, segundo Matos et al.<sup>(20)</sup>, em: a) morfologia do acrossoma e viabilidade (% de espermatozoides vivos, não obrigatoriamente viáveis); e b) análise espermática (células normais e células lesadas). Os espermatozoides vivos coram-se em um tom de azul bem claro tendendo ao branco, já os que estão mortos e permitem a entrada do corante na célula, apresentam-se em um tom de azul escuro.

Da mesma forma, o teste de resistência osmótica<sup>(21)</sup> foi realizado em D0, D2 e D4 e permitiu a avaliação da funcionabilidade da membrana plasmática. A técnica consistiu da adição de 1 mL de sêmen diluído em 15 mL de água destilada (solução A) e incubados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Após esse período, 0,5 mL de formol salina a 1%<sup>(22)</sup> (solução B) foi adicionado a 1 mL da solução A. Da solução B foi retirada uma alíquota de 15  $\mu$ L, sendo a preparação úmida à microscopia óptica em aumento de 400x, e foram contadas 200 células. Espermatozoides com membrana plasmática

íntegra apresentaram diferentes padrões de cauda enrolada. Amostras de sêmen são consideradas satisfatórias quanto à integridade funcional da membrana plasmática quando apresentam no mínimo 50% de espermatozoides com cauda enrolada.

Para análise dos dados foi utilizado o programa *Graphpad prisma 5.0*, por meio dos parâmetros de estatística descritiva como média e desvio-padrão. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso. Os testes utilizados foram: a) Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, para os dados não paramétricos; b) para os dados paramétricos foi aplicada a ANOVA e para a comparação entre médias, o teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

## Resultados e Discussão

A fração espermática do sêmen *in natura* proveniente dos 36 ejaculados analisados no experimento apresentou aspecto normal (coloração branco leitoso), volume médio de  $249,4 \pm 37$  mL e concentração média de  $340,4 \times 10^6 \pm 72$  spz/mL. Tais características estão dentro dos padrões convencionais para a espécie suína<sup>(23)</sup>. Os ejaculados apresentaram resultados médios para a motilidade de  $90 \pm 6,3\%$  e para o vigor de  $4,0 \pm 0,6$ , ficando dentro dos padrões mínimos estabelecidos pelo protocolo deste experimento ( $\geq 3,0$  e  $\geq 70\%$  para vigor e motilidade, respectivamente).

Uma queda dos valores do vigor e da motilidade espermática, durante o período de conservação do sêmen, foi observada em todos os tratamentos. Essa redução pode ser explicada em decorrência do crescimento bacteriano, observada através de análises microscópicas, no meio diluente do sêmen, possivelmente devido a uma incompetência da ação antibiótica presente no meio diluente<sup>(14)</sup>. É sabido que diversos microrganismos colonizam a uretra masculina em condições normais, até porque o plasma seminal contém várias substâncias com propriedades antimicrobianas, que funcionam como uma barreira, evitando a proliferação bacteriana<sup>(24)</sup>. Contudo, quando a contaminação ultrapassa a faixa de normalidade, elas podem se tornar potencialmente patogênicas, podendo levar ao desenvolvimento de infecções. Sua atuação negativa age principalmente sobre a vitalidade e motilidade espermática<sup>(25)</sup>, mas em alguns casos a morfologia e integridade acrossomal também podem ser afetadas<sup>(26)</sup>.

A contaminação bacteriana pode ter ocorrido durante a coleta do ejaculado ou durante o seu processamento<sup>(27)</sup>. Os efeitos da contaminação bacteriana sobre as doses de sêmen não são observadas imediatamente, mas após 36 a 48 horas de armazenamento, quando problemas como aglutinação espermática e redução da motilidade passam a ser evidenciados<sup>(27)</sup>. Esse foi exatamente o período transcorrido para se observar os efeitos deletérios da contaminação nas amostras do presente trabalho. Segundo alguns autores<sup>(28)</sup>, a contaminação microbiológica do sêmen por agentes patógenos pode ocasionar uma redução da performance reprodutiva, pois muitas bactérias têm ação espermicida quando incubadas com o sêmen diluído. Isso se deve aos produtos do metabolismo bacteriano conter endotoxinas, que parecem ter um efeito negativo sobre a motilidade espermática<sup>(27)</sup>.

Esses dados ressaltam a importância de se coletar o ejaculado utilizando-se um protocolo de contaminação mínima, em que dificilmente a contaminação será capaz de produzir efeitos deletérios na qualidade seminal e, como consequência, sobre a dose inseminante.

Os tratamentos T3, T4 e T5 foram os que apresentaram os melhores valores para o vigor espermático no D0 ( $2,4 \pm 0,8$ ;  $2,5 \pm 1,1$  e  $2,8 \pm 0,9$ , respectivamente), não apresentando diferenças significativas entre si. Nos demais dias de conservação, não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Entretanto, quando utilizada uma concentração mais baixa da gema de ovo (1%), bem como na sua ausência, os resultados do vigor espermático chegaram a zero já a partir do D2, indicando que sua presença em concentrações maiores pode proporcionar uma melhor condição para a manutenção da célula espermática suína sob refrigeração, comprovando sua ação protetora (Tabela 1). A ação protetora da gema de ovo já foi descrita por alguns autores<sup>(29, 30)</sup> que computam esse efeito às lipoproteínas de baixa densidade, que permanecem firmemente ligadas aos espermatozoides, estabilizando a membrana espermática pela neutralização dos componentes deletérios existentes no plasma seminal.

A mesma tendência foi observada para a porcentagem de células móveis. Os diluentes acrescidos da gema de ovo nas concentrações de 3, 5 e 7% mostraram-se mais eficientes na manutenção da motilidade espermática que nos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ), obtendo-se, respectivamente,  $77 \pm 15\%$ ,



74±23% e 81±16% no D0 (primeiro dia de conservação). Após 24 horas de refrigeração (D1), a gema de ovo proporcionou melhores resultados de motilidade (T2, T3, T4 e T5), mas sem diferenças significativas entre tratamentos, sendo, entretanto, superiores a T1 (P<0,05). Nos demais dias de análise não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 2).

Os padrões aceitos para utilização de sêmen para a inseminação artificial após refrigeração determinam uma motilidade maior que 60% (2). Essa característica foi observada em todos os tratamentos no D0, com exceção do T1 (controle), o que demonstrou a ação favorável da gema de ovo na manutenção da viabilidade espermática e a sua eficiência como componente de diluentes.

Uma provável resposta à redução das características de vigor e motilidade espermática foi a presença de bactérias no meio diluente, visualizadas a partir de D1, durante as análises microscópicas. Contrariamente ao que se esperava, uma das prováveis fontes de contaminação pode ter sido a presença da gema de ovo, já que ela foi vista em todos os tratamentos, com exceção do controle. Isto pode ter acontecido devido à manipulação incorreta durante o preparo do meio diluente. Alguns autores (31) explicam que contaminações bacterianas podem afetar a qualidade do sêmen ao produzir compostos espermicidas. Além disso, a presença de elevadas concentrações de bactérias no sêmen pode expor o trato genital das fêmeas inseminadas à contaminação (14).

**Tabela 1.** Vigor espermático (escala de 0 a 5) do sêmen suíno diluído em ACP-103® acrescido de diferentes concentrações de gema de ovo em pó e conservado a 17 °C durante cinco dias

Tratamentos (%)	Período de refrigeração (dias)				
	D0	D1	D2	D3	D4
<b>GOP 0%</b>	0,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 1%</b>	1,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 3%</b>	2,4 ± 0,8 <sup>c</sup>	1,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 5%</b>	2,5 ± 1,1 <sup>c</sup>	0,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 7%</b>	2,8 ± 0,9 <sup>c</sup>	1,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,0	0,0

a, b, c, letras diferentes na coluna, indicam diferenças significativas (p<0,05) – teste de Kruskal-Wallis.

**Tabela 2.** Porcentagem de espermatozoides móveis do sêmen suíno diluído em ACP-103® acrescido de diferentes concentrações de gema de ovo em pó e conservado a 17 °C durante cinco dias

Tratamentos (%)	Dias de conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
<b>GOP 0%</b>	36 ± 22 <sup>a</sup>	13 ± 18 <sup>a</sup>	1 ± 5,1 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 1%</b>	63 ± 27 <sup>b</sup>	31 ± 30 <sup>b</sup>	2 ± 7,3 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 3%</b>	77 ± 15 <sup>b,c</sup>	31 ± 29 <sup>b</sup>	2 ± 5,7 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 5%</b>	74 ± 23 <sup>b,c</sup>	27 ± 32 <sup>b</sup>	3 ± 13,0 <sup>a</sup>	0,0	0,0
<b>GOP 7%</b>	81 ± 16 <sup>c</sup>	28 ± 33 <sup>b</sup>	2 ± 9,0 <sup>a</sup>	0,0	0,0

a, b, c, letras diferentes na coluna, indicam diferenças significativas (p<0,05) – teste de Kruskal-Wallis.

O teste de viabilidade espermática utilizando o corante azul de bromofenol permitiu a diferenciação entre células vivas e mortas. Foi observado também que nos tratamentos que continham gema de ovo, a visualização das células foi dificultada por ela se impregnar com o corante e formar grumos com os espermatozoides. Desta forma, um maior número de campos de microscópio foram analisados a fim de se poder contar o mínimo de células possíveis de serem visualizadas para as análises. Em D0, apesar de os mais altos valores médios de células vivas serem encontrados nos tratamentos com as maiores concentrações de gema de ovo (T3, T4 e T5), esta análise revelou não haver diferença estatística entre todos os tratamentos avaliados (Tabela 3). Resultado semelhante foi observado em D2. Como era esperado, foi observada uma queda da viabilidade espermática com o decorrer dos dias de refrigeração do sêmen, que pode ser explicada pelo acúmulo no meio

diluyente de substâncias tóxicas ao espermatozoide, com alteração de pH e osmolaridade do meio, já que, com o decorrer do tempo, há consumo do substrato energético e produção de catabólitos<sup>(32)</sup>. Este problema pode ter sido reforçado pela presença de bactérias no meio, fato este que explicaria nenhuma célula viva ter sido vista no D4, pois, normalmente, após um período de cinco dias de refrigeração, são encontradas, ao menos, de 15 a 20% de células vivas no sêmen diluído<sup>(15)</sup>.

**Tabela 3.** Porcentagem de espermatozoides vivos (viabilidade) no sêmen suíno diluído em ACP-103<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo em pó e conservado a 17 °C durante cinco dias

Tratamentos (%)	Período de refrigeração (dias)		
	D0	D2	D4
<b>GOP 0%</b>	55 ± 36,7	13,0 ± 14,5	0,0
<b>GOP 1%</b>	39 ± 26,1	17,0 ± 19,7	0,0
<b>GOP 3%</b>	72 ± 18,7	22,0 ± 18,2	0,0
<b>GOP 5%</b>	70 ± 23,8	28,0 ± 28,8	0,0
<b>GOP 7%</b>	78 ± 21,7	34,8 ± 32,0	0,0

a, b, c, letras diferentes na coluna, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) – teste de Dunn's.

A análise da porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto não indicou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). Esses resultados demonstram que a gema de ovo não teve ação deletéria sobre a célula espermática do suíno. Testes utilizando concentrações de 0, 5 e 20% de gema de ovo na conservação dos espermatozoides do epidídimo de veados<sup>(3)</sup> apresentaram resultados semelhantes aos deste trabalho. Por outro lado, percebeu-se que, no T1, com ausência da gema de ovo, a porcentagem de células normais caiu 17,2% entre o D0 e o D4 (58% e 48%, respectivamente), fato este que não aconteceu nos demais tratamentos. Comparações foram feitas entre diferentes concentrações de gema de ovo para o resfriamento a 5 °C do sêmen canino<sup>(33)</sup> diluído também em água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>) e, ao contrário deste trabalho, observou-se redução significativa no percentual de espermatozoides morfológicamente normais, após dois dias no grupo contendo 20% de gema de ovo. Desta forma, a possível ação da gema de ovo na proteção do espermatozoide deve ser mais bem estudada e entendida.

Apesar de a gema de ovo não ter aparentemente interferido nos resultados de viabilidade e morfologia espermáticas, a análise espermática destas características foi dificultada pela crescente concentração deste componente no meio diluyente. O mesmo problema foi encontrado por outros autores, ao compararem diferentes concentrações de gema de ovo em pó (5, 10 e 20%) adicionada ao diluyente água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>) na criopreservação do sêmen canino<sup>(34)</sup>. Desta forma, ressalta-se a necessidade de se encontrar uma concentração que possa permitir, além de uma melhor ação protetora sobre o espermatozoide, uma minimização do inconveniente da visualização, ao se fazer a análise computadorizada<sup>(35)</sup>. Neste tipo de avaliação, as gotículas de lipídeos da gema de ovo podem ser computadas como sendo espermatozoides se estas possuírem a mesma dimensão de sua cabeça.

Na análise da resposta ao teste hiposmótico, todos os tratamentos mostraram-se eficientes nas primeiras 24 horas de refrigeração (D0), já que foi obtida uma quantidade superior a 50% de células espermáticas com cauda enrolada. As avaliações de integridade funcional da membrana não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos analisados (Tabela 5), durante todo o período de refrigeração seminal. Uma diminuição da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra foi observada durante a conservação; entretanto, percebeu-se que esta queda foi mais suave quanto maior era a concentração de gema de ovo no meio diluyente, o que está de acordo com outros autores<sup>(5, 10)</sup>, uma vez que meios contendo gema de ovo preservam a qualidade espermática e previnem a reação precoce do acrossoma, podendo preservar uma boa viabilidade espermática até 10 dias de refrigeração, desde que a temperatura de refrigeração seja mantida.

**Tabela 4:** Análise de porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto no sêmen suíno diluído em ACP-103<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo em pó e conservado a 17 °C durante cinco dias

Tratamentos (%)	Período de refrigeração (dias)		
	D0	D2	D4
<b>GOP 0%</b>	58 ± 22,8	48 ± 19,1	48 ± 19,6
<b>GOP 1%</b>	46 ± 24,8	56 ± 23,3	56 ± 21,7
<b>GOP 3%</b>	49 ± 27,2	57 ± 14,7	57 ± 15,2
<b>GOP 5%</b>	51 ± 23,8	59 ± 22,2	59 ± 23,9
<b>GOP 7%</b>	53 ± 25,7	62 ± 19,2	62 ± 19,4

a, b, c, letras diferentes na coluna, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) – teste de Dunn's.

**Tabela 5:** Análise de resistência osmótica do sêmen suíno conservado a 17 °C em diluente ACP-103<sup>®</sup> adicionado de diferentes concentrações de gema de ovo em pó

Tratamentos (%)	Dias de Conservação		
	D0	D2	D4
<b>GOP 0%</b>	53±16,4	39±18,5	25±4,0
<b>GOP 1%</b>	57±14,8	42±17,2	28±3,2
<b>GOP 3%</b>	57±14,6	38±16,6	32±1,5
<b>GOP 5%</b>	51±13,3	32±14,4	30±3,1
<b>GOP 7%</b>	54±14,2	33±17,2	34±7,5

a, b, c, letras diferentes na coluna, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) – teste de Dunn's.

## Conclusões

Os resultados deste experimento permitiram concluir que a gema de ovo em pó, em concentração que varie entre 3 e 7%, pode ser adicionada ao diluente alternativo ACP-103<sup>®</sup> visando à conservação do sêmen do varrão. Entretanto, sua exata função e concentração ideal ainda precisam ser determinadas de forma a se poder explorar melhor toda a potencialidade de seus componentes, permitindo uma melhor manutenção da viabilidade espermática durante a refrigeração prolongada.

## Referências

1. Johnson, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. *Biology of Reproduction*. 1994;16:303-26.
2. Bortolozzo, F.P.; Wentz, I.; Dallanora, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005;33(1):17-32.
3. Fernández-Santos, M.R. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated of red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*. 2006; 41:114-118.
4. Ruvalcaba, G.J.A.; De Alba, C.; Corcuera, B.D.; Conde, P.; Higuera, M.; Casanova, B.; De MARTIN, C. Avanços nas técnicas de descongelamento e aplicação do sêmen suíno congelado. *Suínos e Cia*. 2003;(3):42-44.
5. Iguer-Ouada, M.; Verstegen, J.P. Long-term preservation of chilled canine sêmen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. 2001;55(2):671-684.
6. Salgueiro, C.C.M.; Nunes, J.F.; Oliveira, K.P.L. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2002;1(5):96-98.

7. Andrabi, S.M.H. Fundamental Principles of Cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* Bull Spermatozoa. International Journal of Agriculture and Biology. 2007;9(2):367-369.
8. Quinn, .P.J; Chow, P.Y.W.; White, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction and Fertility. 1980;60:403-407.
9. Melo, M.I.V.; Henry, M.; Beker, A.R.C. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2005;57:757-763.
10. England, G.C.W.; Ponzio, P. Comparisons of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology. 1996;46:165-171.
11. Segovia, M.; Jenkins, J.A.; Paniagua-Chavez, C. Tiersch, T.R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Niletilapia. Theriogenology. 2000; 53(7):1489-1499.
12. Bathgate, R.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. Studies on the effect supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on *in vitro* post-thaw sperm quality. Reproduction in Domestic Animals. 2006;41:68-73.
13. Bousseau, S.; Brillard, P.; Marquant; L.E.; Guienne, B. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology. 1998;50:699-706.
14. Toniolli, R.; Fiúza, R.F.; Jatahy, P.C.; Barros, D.Q.; Santos, B.S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle bacteriano do ejaculado do varrão. Ciência Animal. 2001;11:33-38.
15. Toniolli, R.; Toniollo, G.H.; Franceschini, P.H., Morato, F.M.A.C. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação *in vitro* e *in vivo*. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2010; 62(5):1072-1079.
16. Iplance. Fundação Instituto de Pesquisa e Informação do Ceará, 2013. Portugues.
17. Silva, A.R.; Cardoso, R.C.S.; Silva, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. Ciência Rural. 2000;30(6):1021-1025.
18. Phillips, P. H. Preservation of bull semen. Journal of Biological Chemistry. 1939;130:415-421.
19. Mededeiros, A.A.; Araújo, A.A.; Moura, A.A.A.; Cavalcante, J.M.M.; Figueirêdo; Rodrigues, L.F.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método de coloração vital para a avaliação do espermatozoide ovino. Revista Ciência Agrária. 2006;46:287-297.
20. Matos, D.L.; Araújo, A.A.; Roberto, I.G.; Toniolli, R. Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen do varrão. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2009;10(4):999-1009.
21. Grahan, J.K. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology. 2005;64:492-504.
22. HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. Journal of Microscopic Society. 1957;76:84-97.
23. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3<sup>th</sup> ed. Belo Horizonte; 2013. 104p. Português.
24. Hall SH, Hamil KG, French FS. Host defense proteins of the male reproductive tract. Journal of Andrology. 2002;23:585-597.
25. Merino G, Carranza-Lira S, Murrieta S, Rodriguez L, Cuevas E, Moran C. Bacterial infection and semen characteristics in infertile men. Archives of Andrology. 1995;35:43-47.
26. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpysz M. Bacterial infection and semen quality. Journal of Reproduction and Immunology. 2005;67:51-56.



27. Althouse, G.C.; Pierdon, M.S.; Lu, K.G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extend porcine semen. *Theriogenology*. 2008;70:1317-1323.
28. Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C. Storage of boar semen *Animal Reproduction Science*. 2000;62:143-172.
29. Aurich, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2005;89:65-75.
30. Andrabi, S.M.H.; Ansari, M.S.; Ullah, N.; Anwar, M.; Mehmood, A.; Akhter, S. Duck egg yolk in extender improves the freezeability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2008;104:427-433.
31. Toniolli, R.; Aires, F.P.; Chaves, R.N.; Fontenelle, C.V.; Freitas, F.V. Avaliação da toxicidade antibiótica sobre a viabilidade espermiática da dose inseminante de sêmen suíno. *Ciência Animal*. 2006;16(1):27-33.
32. Fontenele, O.S.; Cardoso, J.F.S.; Cardoso, R.C.S.; Silva, A.R.; Uchoa, D.C.; Silva, L.D.M. Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciência Animal*. 2002;12(1):153-156.
33. Cardoso, J.F.S.; Paula, N.R.O.; Uchoa, D.C.; Silva, L.D.M. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae*. 2010;1(2):146-152.
34. Barbosa, C.C. Criopreservação de sêmen canino com diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106): Efeito da temperatura de adição do glicerol e da adição de antibiótico. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2007, 82p. Available form: [http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/claudia\\_barbosa.pdf](http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/claudia_barbosa.pdf). Protuguese.
35. Matos, D.L.; Araújo, A.A.; Roberto, I.G.; Toniolli, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2008;32(4):225-232.