

Características quantitativas e qualitativas do sêmen *in natura* de suínos da raça Piau

Quantitative and qualitative characteristics of raw semen of Piau boars

BARROS, Maurício Hoshino da Costa¹; SHIOMI, Hugo Hideki²; AMORIM, Lincoln da Silva²; GUIMARÃES, Simone Elisa Faccioni³; LOPES, Paulo Savio³; SIQUEIRA, Jeanne Broch⁴; PINHO, Rogério Oliveira^{3*}; PEREIRA, Jhonata Vieira Tavares do Nascimento²; GUIMARÃES, José Domingos^{2**}

¹Empresa Perdigão, Videira-SC; ²Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. PH Rolfs s/n, Viçosa-MG, CEP:36570-000, Brasil; ³ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV); *Autor para correspondência: rogerio_op@yahoo.com.br; ⁴ Departamento de Veterinária, Universidade Federal d Espírito Santo (UFES), Alto Universitário, s/n, Alegre-ES, CEP:29500-000, Brasil;** Coordenador da equipe.

Resumo

O objetivo foi caracterizar os aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de cachacos da raça Piau. Foram utilizados 22 ejaculados de cinco machos (1 a 2 anos de idade). O volume dos ejaculados apresentou variações entre 200 e 300 mL e a concentração espermática média foi de $34,8 \pm 13,5 \times 10^9$ espermatozoides/ejaculado. Os valores para motilidade espermática, vigor, coloração supra-vital, teste hiposmótico, defeitos totais dos espermatozoides e de acrossomas normais foram de $83,4 \pm 5,4$; $3,3 \pm 0,5$; $82,6 \pm 0,5$; $88,0 \pm 5,5$; $7,0 \pm 3,0$; e $95,9 \pm 2,7\%$, respectivamente. As características físicas e morfológicas do sêmen dos animais avaliados apresentaram padrão semelhante ao de suínos de linhagens comerciais.

Palavras-Chaves: espermatozóide, sêmen, suíno

Abstract

The objective of this study was characterize physical and morphological aspects of raw semen from Piau boars. Twenty two ejaculates form five male (one to two years of age) were used. The rich volume without gel portion of ejaculates range at 200 and 300 mL and spermatic concentration was $34.8 \pm 13.5 \times 10^9$ spermatozoa per ejaculated. The mean values of sperm motility, vigor, supra-vital color test, hiposmotic, total pathology (total major defects) and normal acrosome was 83.4 ± 5.4 ; 3.3 ± 0.5 ; 82.6 ± 0.5 ; 88.0 ± 5.5 ; 7.0 ± 3.0 ; e $95.9 \pm 2.7\%$, respectively. The physical and morphological semen characteristics of analyzed animals show the same pattern to others pure breed and commercial lines of swine.

Keywords: sperm cell, semen, swine

Introdução

A formação da raça Piau remota aos suínos de origem chinesa, introduzidos no Brasil pelos portugueses durante o período de colonização, e a outras raças estrangeiras originárias das regiões de migração européia. O resultado desse processo de miscigenação contribuiu

Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária é uma publicação semestral da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Garça - FAMED/FAEF e Editora FAEF, mantidas pela Associação Cultural e Educacional de Garça ACEG. CEP: 17400-000 - Garça/SP - Tel.: (0**14) 3407-8000

para que atualmente fosse classificado como “porco tipo banha”, isto é, com aptidão para produção de gordura (Schreiner, 1987). Segundo Pereira (2004), entre as raças suínas catalogadas como de alto risco de extinção, apenas a raça Piau ainda existe.

Manutenção das chamadas raças naturalizadas de suínos (que se formaram a partir dos animais trazidos pelos colonizadores) são fundamentais, visto que, tais raças apresentam características próprias de adaptação aos ecossistemas brasileiros, além de constituírem fontes potenciais de novas variantes genéticas de extrema importância para um futuro próximo na suinocultura nacional (Sollero *et al.*, 2009). Além disso, destaca-se a importância de raças rústicas, não só na economia de subsistência das camadas mais pobres da população rural, como também para eventuais cruzamentos futuros destinados a aumentar a rusticidade de animais derivados exclusivamente de raças importadas (Irgang, 1986).

No Brasil, é considerada a melhor e mais importante raça naturalizada nacional, sendo a que agrega o maior número de estudos e trabalhos publicados (Garcia & Barbosa, 1994). A maioria deles refere-se aos aspectos de desempenho reprodutivo das fêmeas, desenvolvimento ponderal dos leitões, qualidade de carcaça e tendências genéticas de algumas características produtivas e reprodutivas da raça (Barbosa *et al.*, 1985). Entretanto, diante das vantagens oferecidas pelas raças especializadas estrangeiras, as raças nativas foram sendo submetidas a um segundo plano de importância, de modo que a maioria das referências inerentes as raças disponíveis atualmente são antigas e escassas. No estudo dos varrões da raça Piau, permanecem ainda totalmente ignorados os padrões de comportamento social e sexual; efeitos da sazonalidade sobre a reprodução; características físicas, morfológicas e bioquímicas do sêmen e suas relações com a fertilidade; perfil endócrino; dentre outros (Garcia & Barbosa, 1994).

Sendo assim, o presente estudo foi realizado no intuito de caracterizar aspectos andrológicos da raça, na tentativa de contribuir com o conhecimento de sua fisiologia reprodutiva.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Granja de Melhoramento Genético de suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa no período de março de 2008 a março de 2009. Foram utilizados 22 ejaculados de cinco cachacos da raça Piau, com idades variando de 1 a 2 anos, criados em condições intensivas, em baias individuais de 3 x 4 m (12m²) por varrão. Foram fornecidos 2 kg/dia de ração balanceada para reprodutores, sendo oferecido 1 Kg pela manhã e 1 Kg pela tarde (Valença, 2007).

Inicialmente, os animais foram condicionados a coleta de sêmen, realizada com intervalos de uma semana, pelo método da estimulação com a mão enluvada e auxílio de um manequim móvel ou uma fêmea em estro. Após a monta, efetuou-se o desvio peniano e realizaram-se pressões digitais intermitentes na glândula até que ocorresse a ereção e ejaculação completa. Foi considerada ejaculação completa, quando não houve mais ereção parcial ou completa do pênis e descida do varrão do manequim. Os ejaculados foram coletados em copos plásticos descartáveis de 700 mL, devidamente esterilizados, protegidos em embalagens térmicas e montados com dupla camada de gases, fixados ao copo com barbante, para reter a fração gelatinosa do sêmen.

Imediatamente após as coletas, foi verificado o aspecto do sêmen (aquoso, opalescente, leitoso e cremoso) e o volume total de cada ejaculado (por meio de uma balança digital), posteriormente procedeu-se a avaliação da motilidade, vigor, morfologia e concentração espermáticas, com o auxílio de um microscópio com contraste de fase, com aumento de 400 a 1250X.

A motilidade espermática progressiva retilínea (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de 0 a 5) foram realizadas acondicionando uma alíquota de 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. A motilidade espermática foi

determinada pela atividade de movimento total dos espermatozóides e o vigor espermático caracterizado pela intensidade de movimento ou de batimento da cauda dos espermatozóides. Para realização da morfologia espermática, uma alíquota de sêmen foi fixada em solução de formol-salina tamponada previamente aquecida (37°C), retirando-se uma gota do preparado e acondicionando-a entre lâmina e lamínula também aquecidas a 37°C, sendo avaliados 200 espermatozóides por ejaculado. Pelo mesmo processo, foi realizada a avaliação da integridade do acrossoma, considerando-se a porcentagem de acrossomas normais. A concentração espermática foi estimada em câmara de Neubauer Improved, utilizando-se uma diluição de 1:200 (sêmen:formol-salina). Para avaliação da integridade da membrana espermática, foram realizados o teste hiposmótico e a coloração supravital.

Para o teste hiposmótico (HO), acrescentou-se uma alíquota de 100 µL de sêmen a 1,0 mL de uma solução de sacarose na concentração de 100 mOsm/L, previamente aquecida a 37°C. Essa solução foi incubada por 60 minutos à mesma temperatura. As amostras foram fixadas em 0,5 mL de solução formol-salina tamponada e, posteriormente, uma amostra de 20 µL da solução foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 100 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase com aumento de 1250x. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada e o resultado foi determinado em porcentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula: $HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HO})$ (Melo & Henry, 1999).

A avaliação de células vivas e mortas foi realizada pelo teste de coloração supravital utilizando solução de eosina (1%) e nigrosina (5%). Homogenizou-se uma amostra de 10 µL de sêmen *in natura* com 10µL de corante, sobre uma lâmina pré-aquecida a 37°C. Em seguida, confeccionou-se um esfregaço sobre a mesma lâmina, e após 20 a 30 segundos, contabilizou-se um total de 100 células sob microscopia óptica em aumento de 200X. Foram

classificadas como células vivas as que permaneceram sem se corar, e as mortas, que se coraram em rosa avermelhado.

Para análise estatística foi empregado o programa estatístico SAEG 9.1 (UFV, 2007). Estatística descritiva (média, desvio-padrão) foi utilizada para todas as variáveis estudadas (motilidade e vigor espermáticos, coloração supravital, teste hiposmótico e integridade de acrossoma). Os dados referentes às avaliações físicas e morfológicas do sêmen e testes complementares foram submetidos aos testes de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Os dados quantitativos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), verificando o efeito de machos e quando houve significância pelo teste “F”, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro. Parâmetros que não atenderam as premissas da ANOVA foram avaliados pela análise não-paramétrica, com comparação de médias pelo teste de Kruskal Wallis. Para verificar a relação entre as características estudadas, foi efetuada análise de correlação simples de Pearson.

Resultados e Discussão

Após três semanas do início do condicionamento dos cachacos, o sucesso da coleta foi alcançado por apenas dois animais e, somente após um período de 6 a 7 meses é que se tornou possível a coleta de mais três animais com auxílio do manequim de madeira, revestidas por couro bovino. O longo período despendido para o condicionamento desses animais deveu-se principalmente a desinteresse total do varrão pelo manequim, descida do manequim com a aproximação do coletador ou mesmo quando era realizada a fixação do pênis e intolerância à presença do manequim nas respectivas baias, ocorrendo às vezes, agressão ao manequim pelos varrões.

A literatura tem descrito procedimentos alternativos para os casos de impossibilidade de coleta de sêmen dos varrões em manequins. Alguns deles, como a tentativa de aumento da

libido dos doadores por meio da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e seus análogos (Kozink et al., 2002) e presença de outro macho jovem juntamente na baía de coleta (Bortolozzo et al., 2005; Bernardi, 2008), além de laboriosos, provavelmente seriam incapazes de estimular os machos, visto que, esses apresentavam impetuosos hábitos comportamentais. Sendo assim, o método alternativo que ajudou durante o período de condicionamento e aceitação do homem pelos varrões da raça Piau no presente estudo foi a exposição dos machos a uma fêmea em estro, o que resultou na possibilidade de coleta de sêmen de todos os varrões utilizados.

Os valores para osmolaridade e pH médio dos ejaculados não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os 5 machos utilizados ($6,45$ e $294 \pm 0,75$ mOsm/Kg), considerados dentro dos valores normais descritos para a espécie. O volume dos ejaculados apresentou variações entre 200 e 300 mL, com aspecto sempre variando de opalescente a leitoso. A concentração espermática média determinada foi de $34,8 \pm 13,5 \times 10^9$ espermatozóides/ ejaculado, valores superiores aos registrados por Garcia & Barbosa (1994) que também estudaram animais da raça Piau ($24,2 \times 10^9$ espermatozóides/ejaculado). Em suínos Hungarian Mangalica, Egerszegi et al. (2008) registraram valores de $490 \pm 160 \times 10^6$ espermatozóides/mL e $894 \pm 308 \times 10^8$ espermatozóides/ ejaculado.

Os valores registrados para motilidade espermática, vigor, teste de coloração supravital, teste hiposmótico, total de defeitos espermáticos e porcentagem de acrossomas normais estão sumariados na tabela 1. Comparativamente, as características físicas e morfológicas do sêmen dos animais utilizados apresentaram padrão semelhante ao de suínos de linhagens comerciais e dentro dos padrões recomendados para a espécie recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Resultados semelhantes foram registrados por Ohata et al. (2005) e Bianchi et al. (2008) para motilidade espermática do sêmen in natura de suínos. Estes autores encontraram valores de 85 e 89,4%, respectivamente, sendo o último valor proveniente de sêmen diluído em BTS. Os resultados obtidos por Garcia & Barbosa (1994), Egerszegi et al. (2008) e Roca

et al. (2010) foram inferiores aos registrados neste estudo para motilidade espermática (61,11; 75,52±6,78 e 76,31±0,88%, respectivamente).

Tabela 1: Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de varrões da raça Piau

Parâmetros	Machos					Geral (n=22)
	377 (n=5)	404 (n=4)	476 (n=5)	491 (n=3)	518 (n=5)	
MOT	87,0±2,7	85,0±4,1	83,0±2,7	75,0±8,7	84,0±4,2	83,4±5,4
VIG	3,2±0,3	3,9±0,2	3,2±0,4	3,3±0,7	3,2±0,3	3,3±0,5
SUP	87,8±7,6	85,2±9,4	77,8±2,9	78,3±5,0	82,4±6,2	82,6±7,1
HO	91,0±2,8	85,5±3,1	90,2±3,9	81,7±11,0	88,4±3,5	88,0±5,5
DT	6,0±1,0	5,0±1,0	8,0±2,0	11,0±3,0	5,0±3,0	7,0±3,0
NAR	97,0±1,0	97,0±1,0	96,0±2,0	91,0±4,0	97,0±2,0	95,9±2,7

MOT = Motilidade espermática; VIG: vigor espermático; SUP: teste de coloração supravital; HO: teste hiposmótico; DT: defeitos totais dos espermatozoides; NAR: número de acrossomas normais.

x±sd = média ± desvio-padrão.

No que diz respeito aos testes complementares empregados, não foram recuperados estudos científicos com o uso do teste hiposmótico e coloração supravital para a avaliação do sêmen de varrões da raça Piau, mas sim de suínos de linhagens comerciais (Pérez-Llano et al., 2001; Bianchi et al. 2008). Bianchi et al. (2008) registraram 35% dos espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (0 mOsm/Kg), valores muito abaixo do observado no presente estudo (88,0%) e também por outros autores como Pérez-Llano *et al.* (2001) (88,0 e 78,3%, respectivamente) que utilizaram soluções hiposmóticas de 75 a 150 mOsm/Kg. Mainard et al.

(2007) registraram valores de $84,3 \pm 3,2\%$ de espermatozóides vivos pela coloração supravital de animais coletados no mês de outubro, resultado semelhante ao presente estudo (82,6%).

Foram registrados no presente estudo valores próximos para os testes HO e SP (88,0 e 82,6%, respectivamente). Segundo Melo & Henry (1999), o teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática (baseada em propriedades osmóticas da membrana plasmática) enquanto que as colorações supravitais mostram a integridade estrutural da membrana espermática (baseado em permeabilidade das grandes moléculas dos corantes). Estas características são importantes para os vários eventos que acontecem durante a fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão dos espermatozóides com o ovócito).

As características morfológicas dos espermatozóides avaliados nos varrões da raça Piau assemelharam-se aos padrões registrados por outros autores. Egerszegi et al. (2008) registraram valores de $5,76 \pm 2,2\%$ de anormalidades espermáticas excluindo a gota distal e $19,6 \pm 7,97\%$ de gota citoplasmática distal em suínos Hungarian Mangalica. Maior porcentagem de defeitos espermáticos foram obtidos por Mainard et al. (2007) quando avaliaram varrões em períodos quentes do ano ($45,8\% \pm 9,9$ e $35,0 \pm 5,5\%$ nos meses de novembro e dezembro, respectivamente). Os autores atribuíram os altos valores de anormalidade espermática ao estresse térmico a que os varrões foram submetidos nos meses citados. Matos et al. (2009) registraram 1% de cabeça alterada, 8 % de acrossoma alterado, 5% de alterações na peça intermediária, 10% de alterações da cauda e 4% de gota citoplasmática proximal em machos da raça Dalland. Na morfologia espermática, em animais da raça Piau, Garcia & Barbosa (1994) registraram maiores médias de patologias espermáticas (10,25%), predominando os defeitos de cauda do espermatozóide ($6,92 \pm 10,71\%$), diferentemente do presente estudo, o qual observou que nenhuma anormalidade morfológica individual ultrapassou limites de 5%.

Ao considerar o efeito dos machos na qualidade espermática, no presente estudo, não foi constatada variação ($p > 0,05$) entre ejaculados do mesmo macho e entre diferentes machos

para nenhum dos parâmetros estudados (quadro 1). Estes resultados não corroboram com os de Ohata et al. (2001) que registraram variação significativa entre machos, mas não observaram efeito na interação macho e tratamento.

Diante do exposto, as características físicas e morfológicas do sêmen dos animais avaliados apresentaram padrão semelhante ao de suínos de linhagens comerciais, estando dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1997) para a espécie. Não foram registradas diferenças para as características estudadas entre machos e entre os ejaculados de cada macho quando avaliadas as características quantitativas e qualitativas do sêmen *in natura* de varrões da raça Piau.

Agradecimentos

À FAPEMIG e CAPES pelo financiamento durante o desenvolvimento da pesquisa.

Referências

- BARBOSA, H.P.; PEREIRA, J.A.A.; COSTA, P.M.A., et al. Exigências de proteína bruta para leitões na fase inicial de crescimento (5 a 15 kg de peso vivo). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 14, n.1, p.45 – 52, 1985.
- BERNARDI, M.L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.5 - 16, 2008.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F., et al. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1978 - 1983, 2008.
- BORTOLOZZO, F.M.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E., et al. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 185p, 2005.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ªed, 49p, Belo Horizonte, CBRA, 1998.

Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária é uma publicação semestral da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Garça - FAMED/FAEF e Editora FAEF, mantidas pela Associação Cultural e Educacional de Garça ACEG. CEP: 17400-000 - Garça/SP - Tel.: (0**14) 3407-8000

- EGERSZEGI, I.; SARLÓS, P.; NAGY, S.Z., et al. Semen characteristics of Hungarian Mangalica boars. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.3, p. 116, 2008.
- GARCIA, S.K.; BARBOSA, A.S. Características etológicas, biométricas e seminais de varrões da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.279 – 289, 1994.
- IRGANG, R. Suínos de raças nativas: o interesse da pesquisa. **Suinocultura Industrial**, v.87, p.13 - 20, 1986.
- KOZINK, D.M.; ESTIENNE, M.J.; HARPER, A.F., et al. The effect of lutalyse on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. **Theriogenology**, v.58, p.1039 – 145, 2002.
- MAINARD, F.; OLIVEIRA, FILHO, J.X.; MARTINS, R.V., et al. Efeito do estresse térmico sobre parâmetros seminais de suínos criados na Baixada Cuiabana. **Anais 17º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Curitiba, PR. Resumo, 2007.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G., et al. Sobrevivência espermática em diferentes taxas de diluição do sêmen de varrão. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.4, p.9999 – 1009, 2009.
- MASCARENHAS, A.G. et al. Uso de diferentes fontes de lipídios e níveis de energia digestível sobre parâmetros testiculares de suínos machos a partir dos 60 kg. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n.3, 2008.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. 1999. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71 – 78.
- OHATA, P.M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M.L. et al. 2001. Viability of frozen swine semen submitted to a pre-freezing equilibrium time in the presence or absence of seminal plasma. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v.29, n.2, p.123 -129.

- OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R., et al. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.69 – 74, 2005.
- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 4^aed., Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004.
- PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P., et al. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**, v.56, p.387 – 398, 2001.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G., et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2692 - 2699, 2010.
- Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas**. UFV, 2007.
- SCHREINER, J.L.C. As raças nacionais de suínos. **Suinocultura Industrial**, v.100, p.34- 36, 1987.
- SOLLERO, B.P.; PAIVA, S.R.; FARIA, D.A; GUIMARÃES, S.E.F; CASTRO, S.T.R.; EGITO, A.A.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PIOVEZAN, U.; BERTANI, G.R.; MARIANTE, A.S. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v.123, n.1, p.8 - 15, 2009.
- VALENÇA, R.M.B. Avanços na nutrição de varrões: efeitos sobre o desenvolvimento das características reprodutivas e qualidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.64 - 70, 2007.