



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Priscila Reis Kahwage**

**ELETROEJACULAÇÃO EM CAITITUS (*Tayassu tajacu*):  
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PRÉ E  
PÓS-REFRIGERAÇÃO**

**Belém**  
**2009**

**Priscila Reis Kahwage**

**ELETROEJACULAÇÃO EM CAITITUS (*Tayassu tajacu*):  
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PRÉ E  
PÓS-REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência  
Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural  
Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural  
da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia

**Belém  
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) -  
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém, PA**

Kahwage, Reis Priscila

Eletroejaculação em caititus (*Tayassu tajacu*): Características seminais pré e pós-refrigeração/ Priscila Reis Kahwage; Orientador, Alexandre Rossetto Garcia – 2009.  
75p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, PA, 2009.

1.Reprodução animal. 2. Animal silvestre. 3. *Tayassu tajacu*.  
4. Eletroejaculação. 5. Criopreservação. 6. Amazônia- Brasil. I. Título.

CDD - 21.ed. 571.81

---

**Priscila Reis Kahwage**

**ELETROEJACULAÇÃO EM CAITITUS (*Tayassu tajacu*):  
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PRÉ E  
PÓS-REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência  
Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural  
Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural  
da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém-PA: 20/05/2009

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia  
Embrapa Amazônia Oriental

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Diva Anelie de Araújo Guimarães  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo  
Universidade Federal do Ceará

A meus pais, Nelson Tadeu da Costa Kahwage e Lucilene de Fátima Reis Kahwage por todo amor, ensinamentos e incentivo que me impulsionaram na busca desta conquista. Aos meus irmãos Nelson Tadeu e Luciana pelos momentos de carinho, alegria, amor e incentivo.

Dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ser fonte de força, proteção, inspiração e por me guiar constantemente.

Aos meus pais, Tadeu e Lucilene, pelo dom da vida, pelo infinito amor, ensinamentos e incentivo.

Aos meus irmãos, Luciana e Nelson Júnior, pelos momentos de apoio, carinho e torcida.

Ao Patrick pelo companheirismo e ajuda.

Ao Professor Dr. Alexandre Rossetto Garcia pela oportunidade, paciência, dedicação e valiosas orientações que me ensinaram e incentivaram desde o início. Muito obrigada.

As professoras Dr<sup>a</sup>. Rosemar Luz-Ramos, Dr<sup>a</sup>. Diva Anelie de Araújo Guimarães, Dr<sup>a</sup>. Hilma Lúcia Tavares Dias, Dr<sup>a</sup>. Natália Inagaki de Albuquerque e ao Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi por valiosas sugestões que contribuíram para superação de etapas importantes do trabalho.

Ao amigo Mário Bartha pela ajuda e companheirismo fundamentais para que este trabalho fosse concretizado.

Aos estagiários Daniel, Sebastião Neto, Adriano e Hilma pela grande contribuição e momentos de descontração durante a coleta de dados.

Aos amigos Sâmia Castro, Raimundo Júnior, Natália Barbosa e Talmir Quinzeiro Neto pela ajuda, apoio e incentivo durante toda a caminhada.

Aos funcionários da unidade de pesquisa animal Senador Álvaro Adolpho: Juarez, Zé Carlos, Osvaldo, Januário e Ivanildo pela ajuda e muitos momentos de descontração, e em especial a Deoclécio Chaves de Oliveira pela imprescindível ajuda e incansável disposição para a realização deste trabalho.

Ao funcionário da empresa de segurança Vidicon, Marcelo, pela valorosa ajuda e incentivo.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental pela colaboração e apoio ao ceder animais, funcionários, instalações e equipamentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou tanto o desenvolvimento experimental do projeto “Implementação da metodologia de colheita de sêmen e padronização andrológica de caïtitus (*Tayassu tajacu*)”, processo 474882/2006-3, quanto os meus estudos nesses dois anos de aprendizagem.

À Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e a Embrapa Amazônia Oriental, através do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de proporcionar este sonho e pela minha formação em Medicina Veterinária.

A todos que de alguma maneira ajudaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

## RESUMO

Para implementar um sistema de criação de *Tayassu tajacu* é necessário estudar sua biologia reprodutiva, principalmente os aspectos referentes aos machos. O objetivo do trabalho foi testar a eficiência da eletroejaculação para obtenção de sêmen, descrever o perfil seminal e testar a capacidade de conservação de gametas masculinos sob refrigeração. Foram selecionados 11 machos adultos ( $76,8 \pm 37,8$  meses,  $19,5 \pm 2,7$  kg) para a avaliação da biometria testicular, e 8 deles foram submetidos à eletroejaculação ( $45 \pm 13$  estímulos, 12 volts, 3 segundos/pulso e descanso de 3 segundos). As amostras colhidas foram avaliadas quanto às características físicas (aspecto, cor, volume total, concentração, pH, motilidade e vigor espermáticos) e características morfológicas (viabilidade e defeitos espermáticos). As amostras foram divididas e diluídas em BTS (diluidor de curta duração) ou X-Cell® (longa duração) e mantidas sob refrigeração a 17° C. As amostras foram avaliadas imediatamente após a diluição (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48) de resfriamento. Os animais apresentaram testículo esquerdo com comprimento de  $3,8 \pm 0,4$  cm, largura de  $2,6 \pm 0,3$  cm e consistência de  $2,3 \pm 0,2$ , e testículo direito com  $3,8 \pm 0,5$  cm de comprimento,  $2,7 \pm 0,3$  cm de largura e  $2,3 \pm 0,2$  de consistência. A taxa de sucesso obtida com a eletroejaculação foi de 75,21%. O sêmen apresentou: volume  $0,81 \pm 0,86$  mL, concentração  $137,44 \pm 153 \times 10^6$  spz/mL, pH  $7,92 \pm 0,73$ , motilidade  $52,66 \pm 28,79\%$ , vigor  $2,2 \pm 0,8$ , viabilidade  $55,84 \pm 28,55\%$ , defeitos maiores  $22,87 \pm 12,93\%$ , defeitos menores  $9,11 \pm 5,88\%$  e defeitos totais  $31,52 \pm 13,81\%$ . Não houve variações expressivas na produção e qualidade seminal ao longo dos meses do ano. Não houve diferença significativa entre os diluidores testados, com relação à capacidade de manutenção dos parâmetros seminais durante o período de estocagem, havendo influência significativa do tempo de armazenamento ( $P < 0,05$ ). Nos tempos T0, T24 e T48, o sêmen diluído em BTS apresentou motilidade espermática média de  $56,1 \pm 17,6\%$ ,  $17,9 \pm 23,3\%$  e  $7,7 \pm 19,6\%$ , a viabilidade espermática média de  $60,2 \pm 17,2\%$ ,  $27,9 \pm 23,8\%$  e  $11,7 \pm 20,2\%$ , e defeitos totais médios de  $28,1 \pm 10,8\%$ ,  $37,5 \pm 12,1\%$  e  $41,28 \pm 11,4\%$ , respectivamente. Amostras seminais diluídas em X-Cell® apresentaram motilidade média de  $54,2 \pm 22,1\%$ ,  $27,0 \pm 28,0\%$  e  $14,0 \pm 24,2\%$ , viabilidade média de  $57,8 \pm 21,7\%$ ,  $33,0 \pm 26,9\%$  e  $19,9 \pm 25,6\%$  e defeitos totais médios de  $30,8 \pm 11,2\%$ ,  $41,2 \pm 13,4\%$  e  $44,2 \pm 14,4\%$  nos três tempos avaliados. Assim, a eletroejaculação é eficiente e segura para a obtenção de ejaculados de caaititus, o sêmen produzido possui potencial para estocagem, e pode ser conservado sob 17°C até 24 horas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Tayassu tajacu*, eletroejaculação, perfil seminal, criopreservação.



## ABSTRACT

Studies concerning reproductive biology of collared peccary (*Tayassu tajacu*) are worthy to improve creation system. The aims of this research were testing electroejaculation as safety method to collect semen; describing the seminal profile along the year; and testing the capacity for spermatozoa storage under refrigeration. Eleven adults males ( $76.8 \pm 37.8$  months,  $19.5 \pm 2.7$  kg) were selected for the measurements of testicular length and width. Eight adults males were used to semen collection ( $45 \pm 13$  stimuli, 12 volt, 3 seconds; and resting pulse of 3 seconds). Semen samples were evaluated for physic characteristics (appearance, color, volume, sperm concentration, pH, sperm motility and vigor), and morphological characteristics (sperm viability and sperm defects). Semen samples were split and diluted in two different extenders: BTS (short-term storage) or X-Cell® (long-term storage). Diluted semen samples were maintained under refrigeration at 17°C. The samples were evaluated immediately after dilution (T0), after 24 hours (T24) and 48 hours (T48) of cooling. Animals presented  $3.8 \pm 0.4$  cm on left testicles length,  $2.6 \pm 0.3$  cm on left testicles width and left testicles consistency of  $2.3 \pm 0.2$ ; right testicles presented  $3.8 \pm 0.5$  cm length,  $2.7 \pm 0.3$  cm width and  $2.3 \pm 0.2$  for consistency. The success rate obtained with electroejaculation was 75.21%. The seminal features observed were: volume  $0.81 \pm 0.86$  mL, concentration  $137.44 \pm 153 \times 10^6$  spz/mL, pH  $7.92 \pm 0.73$ , motility  $52.66 \pm 28.79\%$ , vigor  $2.2 \pm 0.8$ , viability  $55.84 \pm 28.55\%$ , primary abnormalities  $22.87 \pm 12.93\%$ , secondary abnormalities  $9.11 \pm 5.88\%$  and total abnormalities  $31.52 \pm 13.81\%$ . There were no significant changes in production and quality semen along the months of the year. There was no significant difference between extenders tested concerning to maintenance capacity of seminal parameters during the storage period of storage; however, significant influence of storage time was observed ( $P < 0.05$ ). Diluted semen in BTS presented at T0, T24 and T48, average sperm motility of  $56.1 \pm 17.6\%$ ,  $17.9 \pm 23.3\%$  and  $7.7 \pm 19.6\%$ , the average sperm viability was  $60.2 \pm 17.2\%$ ,  $27.9 \pm 23.8\%$  and  $11.7 \pm 20.2\%$ , and the average total defects were  $28.1 \pm 10.8\%$ ,  $37.5 \pm 12.1\%$  and  $41.28 \pm 11.4\%$ , respectively. Semen samples diluted in X-Cell® presented at T0, T24 and T48 average motility of  $54.2 \pm 22.1\%$ ,  $27.0 \pm 28.0\%$  and  $14.0 \pm 24.2\%$ , average viability of  $57.8 \pm 21.7\%$ ,  $33.0 \pm 26.9\%$  and  $19.9 \pm 25.6\%$  and total defects were  $30.8 \pm 11.2\%$ ,  $41.2 \pm 13.4\%$  and  $44.2 \pm 14.4\%$ . Thus, electroejaculation is an effective and safe method to obtain seminal samples from collared peccary, the semen of collared peccary has potential for storage and can be maintained under 17° C up to 24 hours.

**KEY-WORDS:** *Tayassu tajacu*, electroejaculation, seminal profile, cryopreservation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1	Quadro 1- Composição química de 100 gramas do diluidor BTS ( <i>Beltville Thawing Solution</i> – IMV Technologies, L’Aigle, França)..... 25
Foto 1	Machos e fêmeas de caititus ( <i>Tayassu tajacu</i> ) mantidos em baias coletivas (Fonte: GARCIA, 2007)..... 27
Foto 2	Mensuração do comprimento (A) e largura testiculares (B)..... 29
Foto 3	Sessão de estímulos elétricos para colheita de sêmen em caititu ( <i>Tayassu tajacu</i> ) (Fonte: GARCIA, 2007)..... 30
Foto 4	Avaliação da viabilidade espermática de caititus ( <i>Tayassu tajacu</i> ) por coloração supravital com eosina-nigrosina. Aumento de 400 vezes (Fonte: GARCIA, 2007)..... 33
Gráfico 1	Correlação entre comprimentos e larguras dos testículos esquerdo e direito, em animais adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> mantidos em cativeiro..... 37
Gráfico 2	Correlação entre peso e comprimentos dos testículos direito e esquerdo de machos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> ..... 38
Gráfico 3	Correlação entre peso e larguras dos testículos direito e esquerdo de machos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> ..... 39
Gráfico 4	Distribuição da frequência do peso corpóreo observado e variação de comprimento e largura testiculares de caititus mantidos em cativeiro, ao longo do ano..... 40
Gráfico 5	Eficiência na obtenção de ejaculados a partir do protocolo de eletroejaculação testado em machos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> (117 amostras)..... 42
Gráfico 6	Variação mensal da motilidade e viabilidade espermáticas em sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> , para machos em idade reprodutiva mantidos em cativeiro..... 49
Gráfico 7	Variação mensal de defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais em sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> , para machos em idade reprodutiva mantidos em cativeiro..... 50

Gráfico 8	Características seminais de machos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> , observadas nos períodos mais chuvoso e menos chuvoso do ano.....	52
Gráfico 9	Características do sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído em BTS ou X-Cell® observadas durante 48 horas de conservação.....	57
Gráfico 10	Motilidade e viabilidade espermáticas em sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell®, durante 48 horas de conservação.....	60
Gráfico 11	Ocorrência de defeitos maiores, menores e totais no sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell®, no decorrer de 48 horas de conservação.....	63

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Médias ( $\pm$ DP) dos parâmetros testiculares de 11 machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> criados em cativeiro. Belém-PA, 2009..... 36
Tabela 2	Correlações entre peso, idade e as parâmetros testiculares de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> criados em cativeiro. Belém-PA, 2009..... 37
Tabela 3	Características seminais de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> obtidas por eletroejaculação (65 amostras). Belém-PA, 2009..... 43
Tabela 4	Correlações entre peso corpóreo, parâmetros testiculares e características seminais de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> criados em cativeiro. Belém-PA, 2009..... 47
Tabela 5	Correlações entre as características seminais de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> criados em cativeiro. Belém-PA, 2009..... 48
Tabela 6	Características físicas (média $\pm$ DP) do sêmen de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> observadas no período mais chuvoso e menos chuvoso. Belém-PA, 2009..... 51
Tabela 7	Defeitos espermáticos (média $\pm$ DP) em sêmen de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> observados no período mais chuvoso e menos chuvoso. Belém-PA, 2009..... 51
Tabela 8	Características físicas seminais (média $\pm$ DP) de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. Belém-PA, 2009..... 53
Tabela 9	Defeitos espermáticos (média $\pm$ DP) observados em sêmen de machos adultos da espécie <i>Tayassu tajacu</i> mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. Belém-PA, 2009..... 54
Tabela 10	Características de ejaculados (média $\pm$ DP, valor mínimo-valor máximo) de <i>Tayassu tajacu</i> diluídos em BTS, nos momento da diluição (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48) de conservação sob refrigeração. Belém-PA, 2009..... 55
Tabela 11	Características de ejaculados (média $\pm$ DP, valor mínimo-valor máximo) de <i>Tayassu tajacu</i> diluídos em X-Cell®, nos momento da diluição (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48) de conservação sob refrigeração. Belém-PA, 2009..... 56

Tabela 12	Comparação entre médias de características do sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell®, durante 48 horas de conservação. Belém-PA, 2009.....	57
Tabela 13	Médias ( $\pm$ DP) de motilidade, vigor e viabilidade espermática no sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell®, observadas durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.....	59
Tabela 14	Médias de defeitos maiores, menores e totais (média $\pm$ DP) encontrados no sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell®, durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.....	63
Tabela 15	Defeitos maiores (média $\pm$ DP) observados no sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell® observados durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.....	64
Tabela 16	Defeitos menores (média $\pm$ DP) observados no sêmen de <i>Tayassu tajacu</i> diluído com BTS ou X-Cell® observadas durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BTS** - *Beltsville Thawing Solution*, diluidor de curta duração utilizado para sêmen suíno.
- CBRA** - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- Cm** - centímetro, unidade de medida de comprimento
- cm<sup>3</sup>** - centímetro cúbico, unidade de medida de volume
- DNA** - ácido desoxirribonucléico
- €** -Euro, simbologia da unidade monetária vigente na união européia
- g** - grama, unidade de medida de massa
- °C** - grau Celsius, unidade de temperatura
- Kcal/kg** - quilocaloria por quilograma, unidade de medida de energia por cada unidade de massa
- kg** - quilograma, unidade de medida de massa do sistema internacional de unidades (SI)
- m** - metro, unidade de medida de comprimento
- m<sup>2</sup>** - metro quadrado, unidade de medida de área
- µl** - microlitro, unidade de medida de volume
- µm** - micrometro, unidade de medida de comprimento
- mA** - miliamper, unidade de medida de corrente elétrica
- mg** - miligrama, unidade de medida de massa
- mL** mililitro, unidade de medida de volume
- mm** - milímetro, unidade de medida de comprimento
- MR-A<sup>®</sup>** - Diluidor para sêmen de suínos de longa duração
- ng** - nanograma, unidade de medida de massa
- P** - símbolo estatístico que denota grau de significância entre as variáveis estudadas
- pg** - picograma, unidade de medida de massa
- pH** - potencial hidrogeniônico
- %** - porcentagem, unidade de razão na base 100
- r** - símbolo estatístico que representa o grau de correlação entre variáveis avaliadas
- R\$** - Real, simbologia da unidade monetária brasileira
- sptz** - espermatozóide, gameta masculino
- sptz/mL** - espermatozoides por mililitro, unidade de concentração espermática
- US\$** - Dólar, símbolo utilizado pelo Fundo Monetário Internacional referente à moeda norte-americana
- X-Cell<sup>®</sup>** - Diluidor de longa duração utilizado para sêmen suíno
- ±** - símbolo utilizado entre as unidades estatísticas de média e desvio padrão
- <** - símbolo matemático que indica valores inferiores

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	15
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	18
3.1 ASPECTOS REPRODUTIVOS DE MACHOS.....	18
3.2 COLHEITA DE SÊMEN PELO MÉTODO DA ETROEJACULAÇÃO.....	20
3.3 MEIOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN.....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	27
4.1 LOCAL, ANIMAIS E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	27
4.2 AVALIAÇÃO EXTERNA DE TESTÍCULOS.....	28
4.3 COLHEITA DE SÊMEN POR ELETROEJACULAÇÃO.....	29
4.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	31
4.4.1 Exames imediatos.....	31
4.4.2 Exames de Concentração Espermática.....	32
4.4.3 Avaliação de Viabilidade e Morfologia Espermáticas.....	32
4.5 CONSERVAÇÃO DO SÊMEN.....	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	36
5.1 BIOMETRIA TESTICULAR.....	36
5.2 EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE ELETROEJACULAÇÃO.....	40

5.3	CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CAITITUS MANTIDOS EM CATIVEIRO NA AMAZÔNIA ORIENTAL.....	43
5.3.1	Exames Imediatos (aspecto, cor, volume total, pH, motilidade e vigor espermáticos).....	43
5.3.2	Avaliação da Concentração Espermática.....	45
5.3.3	Avaliação de Viabilidade e Morfologia Espermáticas.....	45
5.3.4	Correlações entre Características Seminais e Biometria Testicular.....	46
5.4	PERFIL SEMINAL AO LONGO DO ANO.....	48
5.5	CONSERVAÇÃO DO SÊMEN.....	55
5.5.1	Efeito do Diluidor na Manutenção da Sobrevivência Espermática.....	55
5.5.2	Efeito do Período de Armazenamento na Manutenção da Sobrevivência Espermática.....	58
6.	CONCLUSÕES.....	66
7.	REFERÊNCIAS.....	67



## 1. INTRODUÇÃO

O caititu (*Tayassu tajacu*), também chamado de catitu, taititu, tateto, cateto, coleira-branca, pecari, porco-do-mato, entre outros (LOBO, 1962) é um mamífero ungulado que habita naturalmente desde o sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, inclusive na Amazônia. Pertence à ordem *Artiodactyla*, à subordem *Nonruminantia*, superfamília *Suoidea* e à família *Tayassuidae* (NOWAK, 1991). A espécie separou-se da família *Suidae* há dezenas de milhões de anos. Portanto, apesar do caititu ser bastante semelhante ao suíno doméstico e ao javali, difere dos mesmos em alguns aspectos biológicos. O caititu é capaz de viver nos mais diversos *habitats*, desde florestas tropicais úmidas até savanas e desertos. É considerado onívoro, pois se alimenta de invertebrados, sementes, raízes, alimentos fibrosos, sobras de legumes, frutos e insetos (DEUSTSCH e PUGLIA, 1988). Em cativeiro, esses animais também se adaptam facilmente a diferentes tipos de alimentos, sendo normalmente ofertados os seguintes: milho, mandioca, abóbora, banana, cana-de-açúcar triturada, silagem de milho, silagem de sorgo e ração comercial de suínos (LIVA et al., 1989).

A espécie produz carne e couro de excelente qualidade, com alto valor agregado. A carne é vendida nas casas comerciais sofisticadas por R\$40,00 o quilo. Luvas feitas com couro de caititu são fabricadas no Peru a um custo de US\$80,00 e comercializadas na Europa por 145,00€, o que equivale a R\$158,40 para a produção e R\$401,65 na comercialização, em cotação atual (BANCO DO BRASIL, 2009). Além disso, a espécie é considerada uma fonte de proteína alimentar, assumindo papel de grande importância na alimentação, principalmente para a subsistência de populações rurais.

Na região amazônica, atividades de caça indiscriminada, tanto de subsistência quanto para atender o comércio ilegal, associadas à destruição de *habitats* pelo avanço da agricultura, pecuária e extração madeireira têm ocasionado a redução de fauna. Redford (1992) estimou em 14 milhões o número de mamíferos caçados para subsistência pela população da Amazônia em 1980. Ademais, a demanda pelo couro de animais silvestres sempre foi atendida através da caça predatória em vários países sul-americanos, especialmente no Brasil. Um levantamento feito por Homma (1992) mostra que a comercialização de pele de caititus entre os anos de 1953 a 1970 chegou a atingir 5.413 toneladas de pele, número considerado alarmante.

A criação de animais silvestres de interesse zootécnico pode ser uma alternativa racional para o aproveitamento econômico da carne e dos subprodutos, além de evitar o

desmatamento de grandes áreas e reduzir a pressão de caça. O caititu está entre as espécies que apresentam maior potencial zootécnico em cativeiro, tanto por sua capacidade produtiva quanto pela existência de mercado para seus produtos. Para a introdução da espécie em cativeiro, seja para conservação ou comercialização, o conhecimento de sua biologia reprodutiva é um dos fatores primordiais (MAYOR et al., 2006). Por isso, para que haja o desenvolvimento de sistemas viáveis de produção do caititu em cativeiro, vários estudos que abordem aspectos reprodutivos, etológicos, sanitários e nutricionais necessitam ser amplamente estudados.

Apesar de alguns resultados de pesquisa sobre os aspectos reprodutivos básicos das fêmeas de caititus terem sido recentemente publicados (GUIMARÃES et al., 2004; MAYOR, 2005; MAYOR et al., 2006; MAYOR et al., 2007a; MAYOR et al., 2007b), a fisiologia reprodutiva dos machos dessa espécie ainda é pouco estudada. Escassos trabalhos sobre anatomia e fisiologia reprodutiva de machos se destacam, como os de HELLGREN et al. (1989), COSTA; HENRY; PAULA (2004), SONNER et al. (2004), COSTA e PAULA (2005) e COSTA; SILVA; SILVEIRA (2007). Assim, há necessidade de estudos mais aprofundados sobre machos, principalmente com relação à eficiência dos métodos de colheita, avaliação seminal, determinação de parâmetros seminais e métodos de conservação do sêmen, visando superar os obstáculos concernentes à sua obtenção e processamento.

Com o domínio desses processos, será possível lançar mão de biotecnologias que possam contribuir para disseminar material genético de animais de melhor conversão alimentar, maximizando o desempenho zootécnico da espécie em criações comerciais. Paralelamente, abrir-se-á caminho para o início da preservação de gametas masculinos *ex situ*, o que pode contribuir em muito para a conservação da espécie em momento futuro.

Neste contexto, são apresentadas como hipóteses de pesquisa: o método de eletroejaculação é adequado para a colheita de sêmen de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu*; machos adultos mantidos em cativeiro apresentam características seminais ao longo do ano que os caracterizam como animais de reprodução não-sazonal; o sêmen de caititus pode ser conservado sob refrigeração até 48 horas sem perder substancialmente suas propriedades originais; o sêmen de caititus pode ser refrigerado e conservado com a mesma eficiência com uso dos diluidores BTS ou X-Cell®.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estudo que colabore para a aplicação de biotécnicas de reprodução artificial na espécie *Tayassu tajacu*, a fim de proporcionar a disseminação de material genético dos melhores machos, possibilitar o melhoramento da produtividade da espécie em cativeiro e a conservação futura.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar a eficiência do método de colheita de sêmen por eletroejaculação para animais da espécie *Tayassu tajacu*, criados em cativeiro na Amazônia Oriental.

b) Avaliar a biometria testicular e os parâmetros do sêmen obtido por eletroejaculação, quais sejam: volume, pH, concentração, vigor, motilidade progressiva, viabilidade e defeitos espermáticos.

c) Descrever o perfil seminal de animais *Tayassu tajacu* criados em cativeiro, durante um período de 12 meses, e verificar a existência de sazonalidade com relação à produção e qualidade do ejaculado.

d) Avaliar a possibilidade de conservação do sêmen de caititus sob refrigeração, por até 48 horas, em dois diferentes diluidores.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS REPRODUTIVOS DE MACHOS

Lochmiller et al. (1985) foram os primeiros pesquisadores que avaliaram a espermatogênese, as características seminais e os níveis de testosterona sérica em machos adultos mantidos em cativeiro durante 3, 6 e 9 semanas sob restrição alimentar. Os níveis séricos de testosterona (pg/mL) após as 3, 6 e 9 semanas foram de  $819 \pm 260$ ,  $558 \pm 182$  e  $432 \pm 160$ , respectivamente. A circunferência escrotal (mm) obtida nos três períodos foi  $184 \pm 6$ ,  $180 \pm 6$  e  $170 \pm 9$  e os volumes (mL) em gel obtidos foram de  $0,3 \pm 0,1$ ,  $0,2 \pm 0,1$  e  $0,1 \pm 0,0$ . Os valores médios das características seminais observadas foram: volume líquido  $1,3 \pm 1,1$  mL, concentração espermática de  $354 \pm 173 \times 10^6$  spz/mL, motilidade de  $49,5 \pm 15,8\%$ , espermatozóides normais  $28,3 \pm 15,2\%$ , anormalidades primárias  $7,2 \pm 5,9\%$ , anormalidades secundárias  $64,4 \pm 15,2\%$  e quantidade total de espermatozóides no ejaculado de  $719 \pm 786 \times 10^6$  spz/mL. Os autores não encontraram variações nas características seminais após a restrição alimentar, havendo diferenças somente no volume em gel, que pode ter sido ocasionado pela diminuição do peso das glândulas acessórias. A redução da circunferência escrotal e dos níveis séricos de testosterona pode deprimir a libido em condições adversas e, conseqüentemente, interferir na habilidade reprodutiva do macho.

Posteriormente, Hellgren et al. (1989) observaram que o ejaculado dos caititus é composto de três frações: uma clara (constituída de secreção das glândulas acessórias e pobre em células), uma rica (onde está a maior parte das células espermáticas) e uma fração gel. No entanto, essas frações não ocorrem em todos os ejaculados. A média de volume líquido ejaculado observada em seus estudos foi de  $1,1 \pm 0,1$  mL (fração clara mais a fração rica em células), o volume em gel foi de  $0,9 \pm 0,1$  mL e o volume total foi de  $2,0 \pm 0,2$  mL. A motilidade espermática alcançou altos níveis na primavera e baixos níveis no verão, havendo variação individual nas amostras de 5 a 90%, com média de  $57 \pm 15\%$ . A concentração espermática e a quantidade de espermatozóides contidos na fração rica foram de  $371 \pm 30 \times 10^6$  spz/mL e  $596 \pm 96 \times 10^6$  spz/mL, respectivamente. A porcentagem de espermatozóides normais, de gota citoplasmática e de anormalidades de cauda variou significativamente por colheita. No entanto, a porcentagem de anormalidades de cabeça não variou significativamente. A média para espermatozóides normais, anormalidades de cabeça, gota citoplasmática distal e patologias de caudas (enrolada e dobrada) foi de 40,2%, 0,7%, 38,8% e 20,1%, respectivamente. Os autores consideraram o sêmen adequado para fertilização e afirmaram

que a espermatogênese do caititu ocorre durante o ano todo, com pequenas mudanças na motilidade espermática.

Estes mesmos autores avaliaram a concentração de testosterona sérica e a biometria testicular de caititus mantidos em cativeiro durante 18 meses (n=8) e de animais *in situ* no inverno (n=22) e verão (n=16). Os autores colheram sêmen durante um ano (fevereiro de 1983 a março de 1984) somente dos caititus em cativeiro. Nestes animais, as variações na concentração sérica de testosterona e das medidas testiculares foram de baixa amplitude, em modelo circanual, com as maiores concentrações de testosterona e maior volume testicular no inverno, de outubro a março (1150 a 1450 pg/mL, 32 cm<sup>3</sup> a 4 cm<sup>3</sup> respectivamente) e mínima no verão, de agosto a setembro (500 a 700 pg/mL, 25 cm<sup>3</sup> a 30 cm<sup>3</sup>, respectivamente). As variações sazonais foram mais pronunciadas em indivíduos considerados dominantes. Nos animais *in situ*, não houve variação significativa na concentração sérica de testosterona com relação à idade e estação (P>0,05), embora os valores mais elevados foram registrados no inverno e em animais adultos. No inverno, a média de concentração sérica para os machos adultos da natureza foi de 865±87 pg/mL e em subadultos foi de 666±205 pg/mL, enquanto que no verão os adultos apresentaram concentração sérica de 659±83 pg/mL e os subadultos apresentaram a média de 368±67 pg/mL. Animais de cativeiro apresentaram níveis circulantes de testosterona ligeiramente mais elevados que animais *in situ* durante o inverno, embora a diferença não tenha sido significativa (1.164±128 pg/mL versus 865±87 pg/mL). Os autores sugerem que o macho pode ser fértil o ano todo, mas a diminuição das concentrações de testosterona sérica durante o verão pode reduzir a libido e a atividade reprodutiva, estando esta diminuição relacionada ao aumento da temperatura ambiente. Outro fator a considerar seria a hierarquia que existe no grupo, em que o macho dominante, mais pesado e com maior concentração sérica de testosterona, pode ter maior rendimento reprodutivo (Hellgren et al., 1989).

Mais recentemente, Costa e Paula (2005) estudaram caititus mantidos em zoológico, com idade entre 10 e 18 anos, as amostras de sêmen colhidas também apresentaram três frações por ejaculado. Os valores médios obtidos foram: volume do ejaculado 3,11±0,9 mL, motilidade espermática progressiva de 48,7±31,5%, vigor de 2,1±1,4 e concentração espermática de 87,0±53,1 x10<sup>6</sup> spz/mL. Houve alta incidência de patologias espermáticas, com significativa variação entre os animais, entre 15,5±2,4% a 55,5±16,1%. Dentre os defeitos menores, a patologia mais freqüente foi cauda dobrada ou enrolada, observada em todos os animais experimentais, com variação de 4,0 a 36,5%. Em relação aos defeitos maiores, a alteração mais observada foi a presença de gota citoplasmática proximal, com

variação de 8,0 a 26%. Segundo os autores, a baixa concentração espermática encontrada, associada à variação na motilidade entre os ejaculados e ao elevado percentual de morfologias espermáticas sugere um quadro de degeneração testicular em todos os animais estudados, provavelmente em função da idade elevada e do estresse determinado pela sua manutenção em cativeiro.

Sonner et al.(2004) avaliaram quanto aos aspectos morfométricos de testículos de 20 caimitus adultos, oriundos de diferentes criatórios, obtidos após o abate dos animais. Os órgãos foram colhidos e mensurados (comprimento, espessura e largura) com auxílio de paquímetro. Os testículos dos caimitus são ovalados, achatados látero-lateralmente, localizados na região pélvica, inclinados dorso-caudalmente e possuem posição intermediária (entre a região perineal e inguinal), posicionados mais ventralmente que nos suínos. Este fato se deve à grande curvatura dorsal que a coluna vertebral desses animais apresenta, posicionando o próprio ânus em uma posição mais ventral, permitindo, assim, que o eixo maior do testículo incline-se. O mediastino testicular está no centro do testículo, ligeiramente desviado para a margem epididimária deste, e termina na extremidade capitata. Os resultados médios para comprimento, largura e espessura de testículos direitos foram  $4,36 \pm 0,38$  cm;  $2,74 \pm 0,27$  cm e  $2,33 \pm 0,46$  cm, respectivamente. Os testículos esquerdos apresentaram  $4,19 \pm 0,36$  cm;  $2,68 \pm 0,31$  cm e  $2,34 \pm 0,28$  cm para comprimento, largura e espessura, não havendo assimetria significativa quando comparado aos direitos. Na análise histológica, foram encontradas espermatogônias, espermátides, espermatozoides, células de Sertoli e de Leydig, típicas de atividade reprodutiva. A rede testicular encontrada se assemelha a dos suínos, caracterizando-se pela presença de uma complexa rede de canais que se interconectam e confluem para a extremidade cranial capitata do testículo.

### 3.2 COLHEITA DE SÊMEN PELO MÉTODO DA ELETROEJACULAÇÃO

A técnica da eletroejaculação consiste na introdução de uma sonda ou eletrodos no reto do animal, no local onde os nervos que suprem os órgãos reprodutores serão estimulados. A voltagem é gradativamente aumentada, e os pulsos de estimulação são rítmicos e repetitivos. É necessária experiência para provocar ereção seguida de ejaculação (HAFEZ, 2004). A eletroejaculação foi usada como alternativa de colheita do sêmen do cachorro, entretanto, os resultados obtidos foram inconstantes e considerados insuficientes para utilização prática de colheita do sêmen. Este método, talvez, seja indicado quando houver

necessidade de amostras de sêmen para efeitos diagnósticos e não possa utilizar os métodos de “mão enluvada” e da vagina artificial (MIES FILHO, 1987). No entanto, Gould; Warner; Martin (1978) afirmam que a eletroejaculação é um método seguro e eficaz para a colheita de sêmen em animais silvestres. Para isso, é necessário estabelecer um protocolo específico para cada espécie, de acordo com as respostas do animal, e usar anestésico apropriado.

Por isso, tentativas de colheitas de sêmen por eletroejaculação têm sido realizadas em diversas espécies de animais silvestres e exóticos. Morato et al. (1998) colheram sêmen de 10 onças pintadas (*Panthera onca*) por eletroejaculação, e obtiveram 54 ejaculados. O volume médio foi de  $7,42 \pm 3,69$  mL, a motilidade foi de  $62,6 \pm 11\%$ , o vigor de  $2,71 \pm 0,52$ , a concentração espermática de  $6,20 \pm 3,03 \times 10^6$  spz/mL, e a porcentagem de espermatozóides normais foi de  $46,7 \pm 5,8\%$ . Os autores concluíram que o método da eletroejaculação foi eficiente para colheita de sêmen na espécie estudada.

Em chinchilas (*Chinchilla lanigera*), Busso et al. (2004) avaliaram os efeitos da anestesia na qualidade do sêmen obtido por eletroejaculação. Doze animais foram submetidos aos estímulos, conscientes ou anestesiados com quetamina a 40 mg/kg. Os resultados obtidos para animais conscientes foram: volume total  $45,0 \pm 11,5$   $\mu$ L, motilidade de  $97,8 \pm 0,9\%$ , concentração espermática de  $175,8 \pm 76,2 \times 10^6$  spz/mL, viabilidade espermática de  $95,8 \pm 1,2\%$ , integridade do acrossoma de  $81,1 \pm 4,2\%$ . Já para animais anestesiados, os resultados obtidos foram: volume total de  $3,9 \pm 0,4$   $\mu$ L, motilidade de  $84,7 \pm 9,4\%$ , concentração espermática de  $204,1 \pm 107,4 \times 10^6$  spz/mL, viabilidade espermática de  $86,7 \pm 5,1\%$  e integridade de acrossoma de  $66,0 \pm 6,6\%$ . Somente sete dos doze animais anestesiados ejacularam, entretanto todos os animais estimulados apresentaram ereção peniana por ação parassimpática, favorecida pela ação da quetamina. Não ocorreram diferenças significativas para concentração espermática, motilidade e integridade de membrana, parecendo não haver ação da anestesia sobre esses parâmetros. Os animais anestesiados necessitaram de 15 estímulos de 12 volts para que ejaculassem, enquanto que animais conscientes foram submetidos a cinco estímulos elétricos de sete volts.

Visando avaliar a eficiência do método, Valle et al. (2004) colheram sêmen de primatas neotropicais da espécie *Alouatta caraya* e obtiveram sêmen com volume de  $0,09 \pm 0,05$  mL; pH de  $8,1 \pm 0,5$ ; concentração espermática de  $649,5 \pm 926,7 \times 10^6$  spz/mL; motilidade progressiva de  $75,7 \pm 18,1\%$ ; vigor de  $3,6 \pm 1,0$ ; porcentagem de espermatozóides vivos de  $68,3 \pm 15,0\%$ ; porcentagem de defeitos primários de  $9,6 \pm 4,5\%$ ; e porcentagem de defeitos secundários de  $11,8 \pm 4,6\%$ . Os autores consideraram o método de eletroejaculação

eficaz e seguro, e recomendaram seu uso para a avaliação do potencial reprodutivo de machos primatas em cativeiro.

Em ensaio realizado para avaliar as características do sêmen obtido por eletroejaculação em queixadas (*Tayassu pecari*), Moreira et al. (2005) utilizaram dois machos adultos, com peso de 36 kg e 46kg, e mais de cinco anos de idade. Cada animal foi colocado em colheita uma única vez. O protocolo de estímulos consistiu de 30 estímulos no total, sendo 10 estímulos de dois volts, seguidos por 10 estímulos de três volts e outros 10 estímulos de quatro volts. No final da primeira série de estímulos obteve-se a amostra, porém somente o animal mais pesado ejaculou. O volume do ejaculado foi de 4,5 mL na primeira alíquota, que apresentava coloração branco-leitosa, e de 27 mL na segunda alíquota, que possuía aspecto seroso. A motilidade e o vigor espermático encontrados na primeira alíquota foram de 70% e 3, respectivamente. A concentração foi de  $235 \times 10^6$  espermatozóides/mL, sendo que as porcentagens de defeitos maiores e menores foram de 14,5% e 8,5%, respectivamente. A segunda alíquota apresentou baixa concentração e todos os espermatozóides estavam mortos. Com base nos dados obtidos, os autores concluíram que é possível realizar a avaliação andrológica de queixadas com sêmen obtido através da eletroejaculação.

Visando a obtenção de sêmen de caititus por eletroejaculação, Costa e Paula (2005) testaram dois protocolos de eletroejaculação em seis machos com idade entre 10 e 18 anos e peso corporal em torno de 25 kg. O protocolo I, usado para colheita em suínos, constituiu de três sessões de 15 estímulos elétricos, intervaladas por três minutos de descanso. Na primeira sessão, foram cinco estímulos de 3 volts, cinco estímulos de 4 volts e cinco estímulos de 5 volts; na segunda, cinco de 5 volts, cinco de 6 volts e cinco de 7 volts; e na terceira sessão foram cinco estímulos de 7 volts, cinco estímulos de 8 volts e cinco estímulos de 9 volts. Cada estímulo tinha duração de três a quatro segundos e era seguido do mesmo período de descanso. O protocolo II constituiu de três sessões de 15 estímulos elétricos de 12 volts cada, aguardando-se um período de três minutos entre as sessões. A duração e o intervalo entre os estímulos elétricos foram os mesmo utilizados no protocolo I. As tentativas de colheita foram realizadas a cada 15 a 20 dias, alternando-se os protocolos utilizados. Somente o protocolo II foi eficiente para colheita de sêmen em caititus, fornecendo amostras suficientes para as análises utilizadas na rotina de um exame andrológico (um total de 24 colheitas).

Giuliano et al. (2007) avaliaram o efeito da eletroejaculação e vagina artificial sobre as características seminais em seis machos adultos de lhamas (*Llama glama*). O método da eletroejaculação obteve sucesso em 100% dos animais enquanto a vagina artificial obteve sucesso em 83%, uma vez que a libido do animal para este método é fundamental. As



características seminais que apresentaram diferença significativa entre os métodos estudados foram o volume total ( $2,78 \pm 1,51$  versus  $2,45 \pm 1,62$  mL;  $P < 0,05$ ) e a porcentagem espermatozoides viáveis ( $65,21 \pm 13,42\%$  versus  $59,23 \pm 12,96\%$ ;  $P < 0,05$ ), com resultados favoráveis à eletroejaculação.

Recentemente, Mollineau; Adogwa; Garcia (2007) comprovaram a eficácia da técnica para obtenção de sêmen de cutia (*Dasyprocta leporina*) e a qualidade do sêmen colhido. A média de tempo para a ejaculação foi de  $5,48 \pm 0,31$  minutos, a voltagem usada para a ejaculação foi de  $9,33 \pm 0,69$  V, o volume do ejaculado foi de  $0,47 \pm 0,12$  mL, o pH foi de  $8,3 \pm 0,09$ . A concentração espermática, a motilidade e a porcentagem de anormalidades foram de  $10^6,7 \pm 31,1 \times 10^6$  spz/mL,  $50,44 \pm 4,44\%$  e  $35,14 \pm 2,76\%$ , respectivamente. Os autores ressaltaram como resultado mais significativo da pesquisa a relação inversa entre tempo para a ejaculação e o volume do ejaculado, sugerindo que o tempo máximo de ejaculação para cutias é de seis minutos.

### 3.3 MEIOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

O espermatozóide apresenta grande sensibilidade ao choque térmico e às etapas do processo de criopreservação, dada a fragilidade da sua membrana plasmática e de seu acrossoma. Para que o sêmen seja conservado *in vitro*, é necessário reduzir a atividade metabólica dos espermatozóides pela diminuição da temperatura do sêmen (WHITE, 1993), que deve ser precedida da adição ao sêmen de líquidos conservadores, conhecidos como diluidores.

Os diluidores são compostos por substâncias com propriedades benéficas à manutenção da vida dos espermatozóides. De acordo com a natureza do sêmen, os diluidores têm propriedades essenciais, quais sejam as de evitar o aumento repentino da acidificação, dar proteção aos espermatozóides contra agentes nocivos e ter uma ação nutritiva celular. Os diluidores devem estar presentes quando se pretende conservar o sêmen por refrigeração. Neste processo, busca-se diminuir a atividade espermática e promover o estado de hipobiose. Ainda que o choque térmico deva ser evitado, o sêmen deve ser mantido em baixas temperaturas de conservação, após ter sido submetido à refrigeração gradativa (MIES FILHO, 1987).

Os diluidores devem apresentar pressão osmótica semelhante à do sêmen para os quais se destinam, devem conter elementos nutritivos que forneçam energia às células e ao mesmo

tempo neutralizar os catabólitos resultantes desta condição. Ou seja, devem ampliar as condições naturais representadas pela frutose e pela capacidade tampão das proteínas do plasma seminal. Devem proteger as células espermáticas contra o choque térmico, restituindo-lhes uma condição presente no epidídimo e que perdem, possivelmente ao se misturarem com eletrólitos das secreções secundárias (MIES FILHO, 1987).

A temperatura de conservação do sêmen varia de acordo com a espécie animal, com o tempo em que o material deverá ser conservado e, também, com os componentes do líquido empregado na conservação. A temperatura de conservação aconselhada para o sêmen de suíno varia de modo amplo (5°C a 20-22°C), dependendo da técnica empregada. No entendimento de certos autores, a temperatura de 5°C seria a mais favorável, por impedir a proliferação de microrganismos. Entretanto, a especial sensibilidade do espermatozóide desta espécie às modificações térmicas recomenda a utilização de temperaturas mais elevadas (15°C) (MIES FILHO, 1987). Esse fator limita a capacidade de armazenamento das células espermáticas, pois a esta temperatura, o metabolismo celular não pode ser desacelerado completamente, favorecendo as alterações morfofuncionais comuns ao processo de conservação *in vitro*, interferindo na fertilidade e fecundidade do sêmen. A intensidade desse processo pode ser influenciada pelas condições de armazenamento, pelo tempo de estocagem ou até mesmo por alguns componentes do meio diluidor, por interferir no grau de desnaturação do DNA durante a criopreservação, tendo efeito negativo na fertilidade (KARABINUS; EVENSON; KAPROTH, 1991).

Outro fator a ser considerado é a velocidade de refrigeração do sêmen, uma vez que, a queda brusca de temperatura provoca um estresse letal para algumas células. Esse estresse é proporcional à taxa de refrigeração, à diferença entre as temperaturas inicial e final, e ao limite mínimo de temperatura. Este processo é conhecido como choque frio, o qual afeta variavelmente as espécies e interfere na sobrevivência espermática. O sêmen submetido à queda brusca de temperatura, sem a presença de diluidores sofre alterações irreversíveis tanto na membrana plasmática quanto na acrossomal, sendo essencial a utilização dos meios de conservação (BALL, 1998). Watson (2000) afirma que mesmo a refrigeração lenta provoca estresse na membrana plasmática, ocasionando alterações estruturais e funcionais.

Há uma variedade de diluentes disponíveis para a diluição e refrigeração de sêmen suíno e estes são classificados de acordo com o tempo de estocagem, podendo ser de curta (até três dias de estocagem) ou longa duração (acima de cinco dias de armazenamento). O *Beltsville Thawing Solution* (BTS) é um dos diluidores de curta duração mais utilizados para sêmen suíno. Contém pequena quantidade de potássio, característica que favorece a bomba de

sódio e potássio, por manter a concentração intracelular deste íon em níveis fisiológicos durante a estocagem, favorecendo a motilidade espermática (ALVAREZ e STOREY, 1982). A composição do diluidor BTS pode ser observada no Quadro 1.

Componentes	BTS (100 g)
Glicose anidra	76,6g
Citrato de sódio diidratado	14,3g
Bicarbonato de sódio	2,6g
EDTA	3,6g
Cloreto de potássio	2,5g
Sulfato de gentamicina	0,4g

Quadro 1- Composição química de 100 gramas do diluidor BTS (*Beltsville Thawing Solution* – IMV Technologies, L’Aigle, França).

Kommisrud et al. (2002) avaliaram a motilidade espermática e a integridade de membrana do sêmen suíno diluído com BTS, estocado a 16-18°C. O sêmen foi avaliado com 6, 30, 54, 78 e 102 horas após a colheita. Os autores observaram que a motilidade apresentou um pequeno declínio entre 6 e 102 horas de estocagem (de 79,8% para 78,4%). A porcentagem de células espermáticas com acrossoma normal foi sendo reduzida com o tempo de estocagem (93,9% às 6 horas, 90,6% às 30 horas, 88,0% às 54 horas, e 84,8% às 78 horas, e 78,2% às 102 horas;  $P < 0,001$ ), indicando maior fragilidade e possível reação acrossômica. Os autores concluíram que o tempo de estocagem interferiu na motilidade e, principalmente, na integridade acrossômica. Foram relatadas variações individuais quanto à manutenção da motilidade espermática durante o armazenamento.

Macháty; Takács; Gáthy (2003) observaram resultados favoráveis ao uso de BTS para conservação de sêmen suíno, ao comparar a capacidade fertilizante de sêmen estocado sob 18°C por quatro dias, quando diluído em BTS ou em diluente de Kiev Modificado. As doses continham  $2,5 \times 10^9$  ou  $5,0 \times 10^9$  espermatozóides para cada diluidor. As doses de BTS contendo  $5,0 \times 10^9$  espermatozóides apresentaram uma taxa de parição maior que a apresentada por Kiev Modificado (74,5% versus 54,2%;  $P < 0,05$ ). Além disso, as fêmeas inseminadas com BTS apresentaram um número maior de leitões vivos por ninhada quando comparadas às inseminadas com Kiev Modificado (9,5 versus 8,9;  $P < 0,05$ ).

De Ambrogi et al. (2006) avaliaram os efeitos de diluidores de longa duração (MR-A® e X-Cell®) e de curta duração (BTS) sobre as características seminais de suínos quanto a motilidade espermática, integridade de membrana plasmática e integridade da cromatina. Após 96 horas de estocagem, a motilidade espermática do sêmen diluído em BTS foi reduzida de 73% para 63%, enquanto que para o diluidor MR-A® a redução foi de 70% para 45% e em X-Cell® de 73% para 50%. A variação na integridade de membrana do sêmen diluído em BTS foi de aproximadamente de 91% a 93%, em MR-A® foi de 90,5% a 93,5% e em X-Cell® foi de 91% a 92%. Não houve diferença significativa entre diluidores com relação à integridade de cromatina. Portanto, diluidores de curta e longa duração não apresentaram diferenças para manutenção da integridade de cromatina e viabilidade espermática, porém a baixa motilidade observada, principalmente após as 96 horas de estocagem, pode afetar significativamente a capacidade fertilizante dos espermatozoides.

Haugan et al. (2007) compararam a fertilidade de fêmeas inseminadas com sêmen diluído com BTS (armazenados por 2 a 3 dias) ou X-Cell® (estocagem por 4 a 5 dias). Das 747 fêmeas inseminadas com sêmen diluído em X-Cell®, 643 pariram (86,1%) e das 713 fêmeas inseminadas com BTS, 618 pariram (86,7%). A média de tamanho da ninhada obtida com sêmen diluído em X-Cell® foi de  $13,4 \pm 0,3$  filhotes, enquanto que para o sêmen mantido com BTS a média foi de  $13,5 \pm 0,3$  filhotes. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas ( $P < 0,005$ ) entre a fertilidade de sêmen diluído com ambos os diluidores. No entanto, os autores afirmam que a manutenção de BTS na rotina da central de inseminação traz vantagem econômica pelo baixo custo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL, ANIMAIS E PERÍODO EXPERIMENTAL

Foram selecionados 11 machos jovens da espécie (*Tayassu tajacu*), com idade média de  $76,8 \pm 37,8$  meses (27,4 a 137,6 meses), pesando em média  $19,5 \pm 2,7$  kg, que foram usados para avaliações de biometria testicular. Destes, 8 animais foram submetidos à eletroejaculação. Os animais eram mantidos no criatório científico da Embrapa Amazônia Oriental, situado na Unidade de Pesquisa Animal Senador Álvaro Adolpho, em Belém-PA (1° 28' S e 48° 27' O).

Os animais foram alojados em baias coletivas de 36 m<sup>2</sup>, com disponibilidade de espaço de 4,1 m<sup>2</sup> por animal, e mantidos em grupos familiares de até 10 indivíduos, constituídos em uma relação macho:fêmea de 1:2 ou 1:3 e identificados com brincos plásticos numerados (Foto 1). As colheitas e análises de sêmen foram realizadas na Embrapa Amazônia Oriental.



Foto 1- Machos e fêmeas de caititus (*Tayassu tajacu*) mantidos em baias coletivas (Fonte: GARCIA, 2007).

A alimentação oferecida foi à base de ração para suínos (crescimento e engorda) com suplemento energético de 2.500 Kcal/kg, com 14% de proteína. Adicionalmente, foram fornecidos frutos, forrageiras e água *ad libitum*. O controle semestral de endoparasitas foi

feito com adição de anti-helmíntico oral para suínos de amplo espectro de ação (mebendazole), na dosagem de 80 mg de vermífugo para cada 50 kg de ração.

Vinte e quatro horas antes do procedimento de colheita de sêmen, o animal a ser estudado foi retirado da baia coletiva, após contenção física feita por puçá, confeccionado com cordas de algodão. O animal foi colocado em baia individual de 6 m<sup>2</sup>, onde permaneceu em jejum hídrico e alimentar até o momento da colheita do sêmen.

O experimento foi desenvolvido de outubro de 2007 a fevereiro de 2009. Os meses de dezembro a maio foram considerados como período “mais chuvoso”, com temperatura média do ar entre 26,5°C e 27,3°C, umidade relativa do ar variando de 83% a 88% e precipitação pluviométrica total mensal entre 450 mm e 600 mm. O período de junho a novembro foi considerado como “menos chuvoso”, com temperatura média do ar entre 27,0°C e 28,2°C, umidade relativa do ar entre 75% e 81% e totais de chuvas mensais entre 100 mm e 200 mm (PACHECO e BASTOS, 2007).

#### 4.2 AVALIAÇÃO EXTERNA DE TESTÍCULOS

Previamente à colheita seminal, foi feita a avaliação externa dos testículos por inspeção, palpação e biometria. Para que se procedesse à avaliação, os testículos foram levemente tracionados e posicionados paralelamente. Durante a inspeção, foram observadas a forma e a simetria testiculares, bem como a possível presença de ferimentos, cicatrizes, abscessos, ectoparasitos, entre outras alterações que pudessem acometer a bolsa escrotal, conforme procedimentos andrológicos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Pelo método da palpação, foram avaliadas a mobilidade (em condições fisiológicas os testículos são móveis em todas as direções), a posição e consistência testicular (que pode variar de flácida a firme). Posteriormente, os testículos direito e esquerdo de cada animal foram individualmente mensurados, com auxílio de um paquímetro manual graduado em milímetro (Foto 2). Para aferir o comprimento, foram considerados somente os testículos, sem a cauda e a cabeça do epidídimo, enquanto que a largura foi medida a partir da porção média até a porção livre de cada gônada (JOHNSTON; ARMSTRONG; BROWN, 1994).

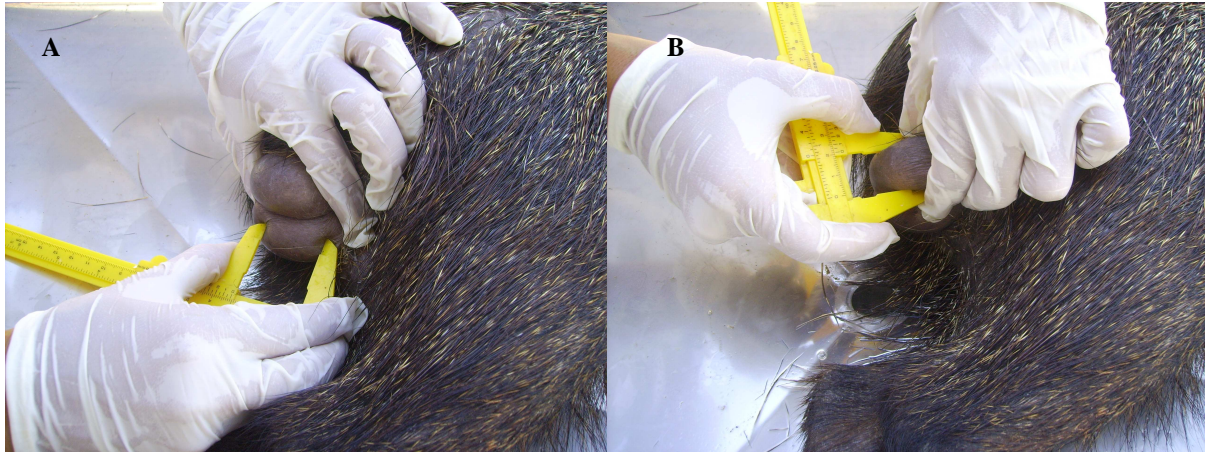


Foto 2- Mensuração do comprimento (A) e largura testiculares (B).

#### 4.3 COLHEITA DE SÊMEN POR ELETROEJACULAÇÃO

Previamente à colheita de sêmen, os animais foram sedados. A frequência das tentativas de colheita por animal foi quinzenal. Os fármacos foram aplicados com uso de seringa plástica descartável de 5 mL e agulha de calibre 25 x 7 mm, por via intramuscular. Primeiramente, foi feita a aplicação da acepromazina (Acepran 0,2%®, Univet S.A., São Paulo-SP, Brasil), como medicação pré-anestésica, na dosagem de 0,2 mg/kg. Após 5 minutos foi aplicada a quetamina (Dopalen®, Vetbrands Saúde Animal, Jacareí-SP, Brasil) na dosagem de 5,0 mg/kg (KAHWAGE et al., 2008a). A injeção dos fármacos foi monitorada de forma que se observasse a sedação, analgesia e relaxamento muscular desejáveis para a colheita. Passados 15 minutos da aplicação dos fármacos, quando o animal já não apresentava reflexos interdigitais e palpebrais, o mesmo foi colocado em uma mesa de aço inox, para que os procedimentos fossem realizados da melhor forma.

Antes da sessão de estímulos elétricos, foram realizadas a remoção fecal e a limpeza cautelosa do reto do animal, para que o eletrodo fosse introduzido e se mantivesse completamente em contato com a mucosa retal e esta com o assoalho da pelve. Antes da introdução do eletrodo, foi realizada a prévia lubrificação do mesmo com carboximetilcelulose (Carbogel®, Carbogel Indústria e Comércio Ltda., São Paulo-SP, Brasil).

Previamente à colheita, foi feito o corte de pêlos mais longos na região do prepúcio, seguido de tricotomia com água, sabão neutro e lâmina de barbear. A limpeza da região prepucial externa foi feita com solução fisiológica pré-aquecida (NaCl 0,9% a 35°C). O interior do prepúcio foi lavado com solução fisiológica pré-aquecida, com auxílio de seringa

de 20 mL e gaze cirúrgica. Foi feita a secagem externa do prepúcio com auxílio de papel toalha descartável.

O equipamento para a eletroestimulação foi semelhante ao utilizado para bovinos (Boijektor 2001®, Comercial Barbôs Ltda., São Paulo-SP, Brasil), contendo um eletrodo retal desenvolvido especialmente pela equipe de pesquisa, segundo as características anatômicas do caititu, com 20 cm de comprimento e 1,9 cm de diâmetro, e três tiras longitudinais paralelas em cobre. Os estímulos elétricos foram regulados por reostato e a intensidade de corrente foi observada através do amperímetro (Foto 3).



Foto 3- Sessão de estímulos elétricos para colheita de sêmen em caititu (*Tayassu tajacu*) (Fonte: GARCIA, 2007).

O animal foi colocado em decúbito lateral e o eletrodo foi inserido no reto e posicionado paralelamente ao assoalho pélvico, a 15 cm de profundidade, de forma que a tira de metal centralizada ficasse em contato com a mucosa retal para estimular a inervação das estruturas envolvidas com ejaculação. O protocolo de eletroestimulação utilizado foi adaptado de Costa e Paula (2005). Foram aplicados  $45 \pm 13$  estímulos seguidos. A voltagem adotada foi de 12 volts e cada estímulo emitido teve duração de 3 segundos, com intervalo de 3 segundos entre os estímulos (KAHWAGE et al., 2008b). A sessão de estímulos só era interrompida quando se iniciava a liberação da fração em gel do ejaculado ou quando o animal não reagia aos estímulos emitidos.



Após os estímulos iniciais, o pênis do animal foi fixado com gaze e direcionado para o interior de um erlenmeyer de 50 mL, pré-aquecido a 35°C e envolto em papel laminado, a fim de evitar o choque pelo frio e a ação da luz solar direta sobre os espermatozóides. Após o recolhimento do sêmen, o erlenmeyer foi colocado em copo térmico para evitar variações de temperatura, e a amostra foi levada imediatamente ao laboratório para análise. Para avaliar a eficiência da eletroejaculação foram realizadas 117 tentativas de colheitas. A taxa de sucesso foi determinada pela quantidade de amostras contendo espermatozóides, em relação ao número total de tentativas de colheita.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

As análises laboratoriais e o processamento das amostras de sêmen colhido foram realizados no Laboratório de Apoio à Reprodução Animal da Embrapa Amazônia Oriental, localizado na Unidade de Pesquisa Animal Senador Álvaro Adolpho, em Belém-PA.

O sêmen levado para o laboratório foi mantido em banho-maria a 35°C, até a finalização das análises. Todo material utilizado para manipular amostras, como tubos, ponteiros, lâminas e lamínulas, foi previamente aquecido a 35°C (VASCONCELOS et al., 2001). Para avaliar o perfil andrológico e eventual sazonalidade na produção de ejaculado, as amostras (61 ejaculados) foram agrupadas de acordo com período mais chuvoso (dezembro a maio, 26 amostras) e período menos chuvoso do ano (junho a novembro, 35 amostras).

##### 4.4.1 Exames Imediatos

Primeiramente, foi realizada a avaliação visual do aspecto do ejaculado, representada por aparência e cor, que dão indicativos da concentração de espermatozóides e da presença de sangue, pus, urina, detritos, entre outros. Em seguida, o ejaculado foi retirado do frasco de colheita por pipeta Pasteur (ponta fina) e colocado em tubo plástico de 15 mL previamente aquecido a 35°C, para a determinação do volume total expresso em mL. Caso houvesse a presença de gel, o mesmo era retirado com pipeta Pasteur (ponta grossa) e transferido para tubo microtubo plástico de 2 mL, sendo pesado em balança analítica (miligramas). Foi, então, aferido o volume ejaculado livre de gel.

Foram avaliados a motilidade e o vigor espermáticos a partir de uma alíquota de 10 µl de sêmen fresco, que foi depositada sobre lâmina de vidro para microscopia, coberta com lamínula de 22 x 22 mm, ambas previamente aquecidas a 35°C. A amostra foi levada ao

microscópio óptico binocular (Eclipse E200®, Nikon Corporation, Tóquio, Japão), sobre platina aquecida a 35°C. A motilidade espermática foi avaliada em escala de 0 a 100% e o vigor em escala de 0 a 5, sob aumento de 100 vezes.

Para a aferição do pH, unidade de medida da concentração hidrogeniônica do sêmen, uma amostra do material obtido foi separada e avaliada em tira de papel indicador colorimétrico, podendo variar de 0 a 14 (pH Tests®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

#### **4.4.2 Exames de Concentração Espermática**

Para a obtenção da concentração espermática foi utilizada uma amostra de 10 µl de sêmen diluído em 990 µl de solução de formalina tamponada (diluição de 1:100), seguida da homogeneização cautelosa da mistura. Uma pequena alíquota foi colocada na câmara de Fuchs-Rosenthal até o completo preenchimento da mesma. A câmara foi levada ao microscópio óptico para que o retículo com 16 quadrados de linhas triplas fosse localizado em objetiva de 40 vezes (cada quadrado possuía área de 1mm<sup>2</sup> e profundidade de 0,2mm). Em seguida, foi feita a contagem de todas as células contidas em 4 quadrados de linhas triplas. O número total de células obtido foi multiplicado por 4, permitindo o ajuste aos 16 quadrados grandes. Posteriormente foi feita a multiplicação por 100, o que corresponde à diluição 1:100 realizada previamente à contagem. O valor obtido foi dividido pelo fator de correção 3,2 (ROTHSCHILD e CLELAND, 1952). O resultado obtido após as conversões descritas acima, indicou o número de células por mm<sup>3</sup>. Para obter o resultado em cm<sup>3</sup> (ou mL), foi feita a multiplicação por 10<sup>3</sup>. Assim, a concentração foi obtida em spz/mL.

#### **4.4.3 Avaliação de Viabilidade e Morfologia Espermáticas**

Para a determinação da viabilidade espermática, uma alíquota de 10µl de sêmen foi depositada em lâmina pré-aquecida a 35°C juntamente com a alíquota de 10µl de eosina-nigrosina, uma coloração do tipo supravital (GALLOWAY, 1974). As duas alíquotas foram gentilmente homogeneizadas para posterior confecção do esfregaço. Após a secagem, a lâmina foi levada ao microscópio óptico binocular, sob aumento de 400 vezes, onde foram contadas 200 células por amostra. As células foram classificadas como viáveis ou inviáveis e o resultado da contagem foi apresentado em porcentagem.

Células cujas membranas plasmáticas não possuem integridade perdem a seletividade e permitem a entrada do corante eosina para o interior celular. As células coradas são

consideradas mortas (inviáveis) e adquirem uma coloração rosada, enquanto as células vivas (Foto 4), com membrana plasmática íntegra, não são coradas e permanecem brancas.

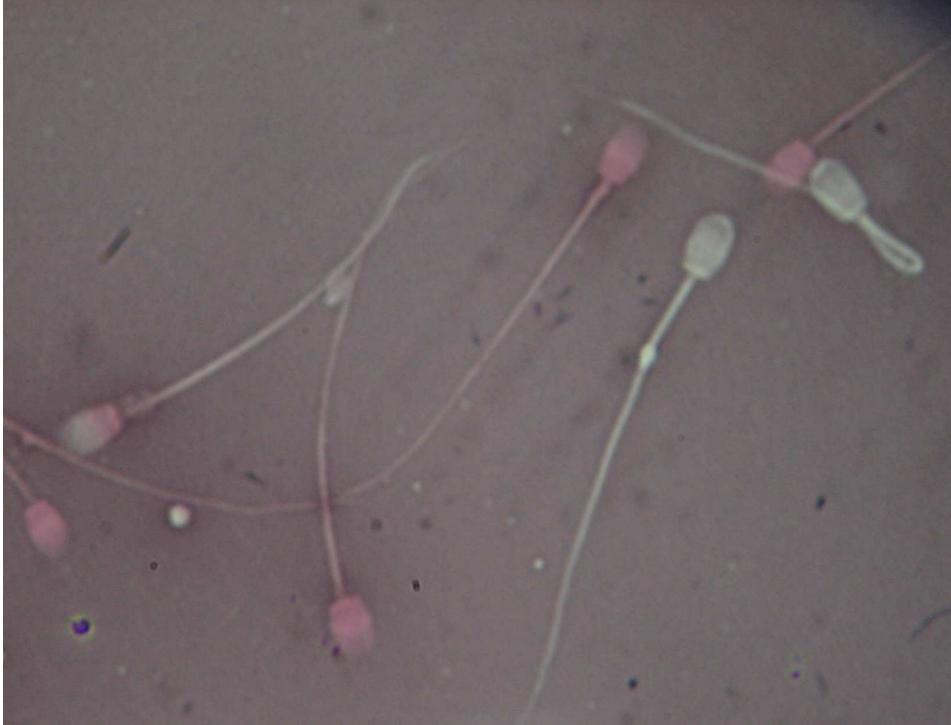


Foto 4- Avaliação da viabilidade espermática de caititus (*Tayassu tajacu*) por coloração supravital com eosina-nigrosina. Aumento de 400 vezes (Fonte: GARCIA, 2007).

Logo após a contagem de células vivas, foi realizada a avaliação de morfologia espermática, em que a lâmina corada com eosina-nigrosina foi levada ao microscópio, sob aumento de 1000 vezes, para detectar células que apresentassem anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda. Foi feita a contagem de 200 células por amostra, com classificação individual das anormalidades, que foram agrupadas em defeitos maiores e menores, sendo os resultados apresentados em porcentagem, conforme descrito por Blom (1950).

#### 4.5 CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

O ejaculado sem gel de 8 machos foi dividido em duas alíquotas de igual volume. Cada alíquota foi diluída em diluidor de curta duração (BTS) ou em diluidor de longa duração (X-Cell®), pré-aquecidos a 35°C. A diluição usada foi de 1:1, para manutenção do sêmen. Foram feitas as avaliações de motilidade, vigor espermático, morfologia espermática e viabilidade

espermática (vivos e mortos), a fim de verificar o efeito dos diluidores e do tempo de estocagem sobre os parâmetros seminais. O sêmen foi avaliado imediatamente após a diluição (tempo zero= T0), após 24 horas (T24) e 48 horas do início da refrigeração (T48).

Após a diluição do sêmen, cada alíquota diluída foi colocada em recipiente contendo água aquecida a 35°C, de forma que toda a alíquota fosse coberta, para que se procedesse à refrigeração. As amostras foram conservadas durante 48 horas sob temperatura controlada (17°C) em refrigerador equipado com termostato, o qual foi aberto apenas no momento da retirada das amostras para análise.

As amostras foram homogeneizadas antes de cada avaliação seminal, para que os espermatozóides que se encontrassem no fundo dos frascos pudessem emergir e serem misturados ao diluente, dispersando os fatores tóxicos resultantes do metabolismo dos mesmos (VASCONCELOS et al., 2001). Uma alíquota do sêmen diluído e refrigerado foi retirada, colocada em tubete plástico e levada ao banho-maria, onde permaneceu em pré-aquecimento a 39°C por 5 minutos antes das avaliações, a fim de que as células em hipobiose retomassem o seu metabolismo (ESTIENNE; HARPER; DAY, 2007).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A biometria testicular e as características seminais de volume, pH, concentração, motilidade, vigor, viabilidade celular, defeitos maiores e defeitos menores e foram analisadas estatisticamente de modo descritivo, com auxílio do programa Microsoft Excel 2007.

Para verificar o grau de associação entre as variáveis de peso, idade, biometria e características seminais, foi aplicado o teste de correlação de Pearson, sendo considerados os valores do coeficiente de correlação acima de 0,5 e estatisticamente significativa quando  $P < 0,01$ . A comparação de médias dos parâmetros seminais avaliados foi feita por análise de variância e para avaliar o efeito do período de colheita sob as características foi utilizado o teste *t de Student*, com nível de 5% de probabilidade. Para o volume, foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, pois esta característica seminal não apresentou distribuição normal dos dados.

As características do sêmen diluído e resfriado foram submetidas à análise de variância, através do método de mínimos quadrados, sendo adotado o delineamento experimental de parcela subdividida. Foram consideradas como parcelas os diluidores BTS e X-Cell® e como sub-parcelas o tempo de imediatamente após a diluição e o período de

armazenamento (T0, T24 e T48), respectivamente. Para determinar a significância dos efeitos dos fatores estudados, foi realizado o teste F e as médias foram comparadas através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados com o uso do programa NTIA, versão 4.2.1 (EMBRAPA, 1997).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 BIOMETRIA TESTICULAR

Os resultados para comprimento, largura e consistência testicular estão sumariados na Tabela 1. Pôde-se observar que não houve assimetria entre as gônadas esquerda e direita, corroborando os dados de Garcia e Barbosa (1994), que não encontraram assimetria evidente ao avaliarem comprimento e largura testicular de varrões da raça Piau (*Sus scrofa domesticus*). Durante todo o período experimental não foram observadas alterações quanto à forma, posição e mobilidade dos testículos.

Os dados morfométricos obtidos neste estudo foram ligeiramente menores do que os observados por Sonner et al. (2004), que encontraram média de 4,27 cm de comprimento e 2,71 cm de largura para testículos de caititus criados em cativeiro. Os valores também foram menores que os observados em caititus por Carvalhal; Cagnoto; Daniel (2000), que encontraram 4,5 cm de comprimento e 2,85 cm de largura e por Hellgren et al. (1989), que verificaram 4,9 cm de comprimento e 2,8 cm de largura. Filgueira et al. (2005) avaliaram testículos de caititus com mais de dez anos e encontraram média de comprimento de 5,5 cm e 5,3 cm para os testículos esquerdo e direito, respectivamente. Possivelmente, a diferença entre o comprimento testicular dos animais deste trabalho e os informados acima tenha ocorrido em função do método de mensuração adotado, pois no presente estudo foram desconsideradas a cabeça e a cauda do epidídimo, possibilitando a obtenção de valores menores.

Tabela 1- Médias ( $\pm$ DP) dos parâmetros testiculares de 11 machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* criados em cativeiro. Belém-PA, 2009.

Parâmetros Testiculares	Testículo Esquerdo	Testículo Direito
Comprimento (cm)	3,8 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5
Largura (cm)	2,6 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,3
Consistência (0-5)	2,3 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2

As correlações entre os parâmetros avaliados podem ser observadas na Tabela 2. Verificou-se alta correlação entre os comprimentos dos testículos direito e esquerdo ( $r=0,9527$ ,  $P<0,0001$ ), entre as larguras dos testículos direito e esquerdo ( $r=0,7960$ ,  $P<0,0001$ ) e a consistência dos testículos direito e esquerdo ( $r=0,9439$ ,  $P<0,0001$ ). O grau de associação

entre o comprimento dos testículos direito e esquerdo e de suas larguras podem ser visualizados no Gráfico 1.

Tabela 2- Correlações entre peso, idade e as parâmetros testiculares de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* criados em cativeiro. Belém-PA, 2009.

	<b>Peso (kg)</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Comp TE (cm)</b>	<b>Larg TE (cm)</b>	<b>Cons TE (1-5)</b>	<b>Comp TD (cm)</b>	<b>Larg TD (cm)</b>	<b>Cons TD (1-5)</b>
<b>Peso</b>	1							
<b>Idade</b>	0,4009	1						
<b>Comp TE</b>	0,6769*	0,1732	1					
<b>Larg TE</b>	0,6474*	0,3550	0,6098*	1				
<b>Cons TE</b>	0,3499	0,2487	0,2874	0,1688	1			
<b>Comp TD</b>	0,6816*	0,1793	0,9527*	0,5500	0,3023	1		
<b>Larg TD</b>	0,6302*	0,2947	0,6375*	0,7960*	0,1105	0,7005*	1	
<b>Cons TD</b>	0,3822	0,2534	0,3044	0,1985	0,9439*	0,3367	0,1630	1

\* P<0,001

Esses resultados estão de acordo com os observados por Filgueira et al.(2005) que constatarem alta correlação entre comprimento ( $r=0,7404$ ) e circunferência ( $r=0,9097$ ) de testículo direito e esquerdo em caititus, enquanto Sonner et al. (2004) encontraram a correlação de média intensidade entre o comprimento dos testículos direito e esquerdo ( $r=0,66$ ) de caititus jovens e adultos oriundos de criatórios extensivos.

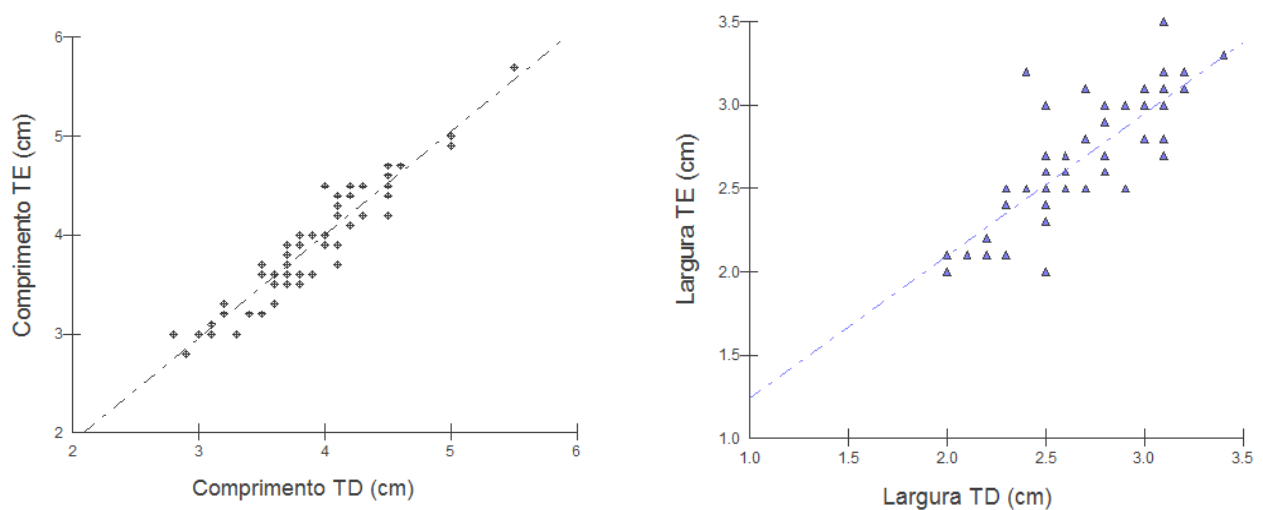


Gráfico 1- Correlação entre comprimentos e larguras dos testículos esquerdo e direito, em animais adultos da espécie *Tayassu tajacu* mantidos em cativeiro.

A correlação positiva entre comprimento, largura e consistência era esperada, uma vez que os testículos são órgãos pares e, normalmente, não há grandes diferenças encontradas entre eles, caso a organogênese tenha se processado adequadamente (SONNER et al., 2004). Além disso, o desenvolvimento normal das gônadas ocorre de forma equivalente nos dois eixos do órgão, de maneira que sejam estabelecidos o formato e a simetria testicular fisiológica, que interferem positivamente na atividade espermato gênica, fator considerado imprescindível para reprodutores. (FILGUEIRA et al., 2005). Além disso, o volume testicular, considerado medida representativa da produção espermática, é influenciado pelo formato testicular, sendo este determinado pelas medidas de comprimento e largura, que podem variar em função da estação do ano, do estado clínico e da nutrição dos animais, tendo como principais conseqüências variações quantitativas e qualitativas na produção seminal (MARTIN et al., 1994).

As correlações entre peso e comprimento dos testículos direito e esquerdo ( $r= 0,6816$  e  $r= 0,6769$ ;  $P<0,0001$  respectivamente), peso e largura dos testículos direito e esquerdo ( $r=0,6302$  e  $r= 0,6474$ ;  $P<0,0001$  respectivamente), apesar de altamente significativas, apresentaram média intensidade, conforme demonstrado nos Gráficos 2 e 3. Louvandini et al. (2008) encontraram correlação de alta intensidade entre peso corporal e comprimento ( $r=0,7$ ) e largura testicular ( $r=0,8$ ) em ovinos da raça Santa Inês sob efeito de suplementação protéica e diferentes cargas parasitárias, concluindo que animais suplementados e com reduzida carga parasitária têm maior ganho de peso e maior tamanho testicular.

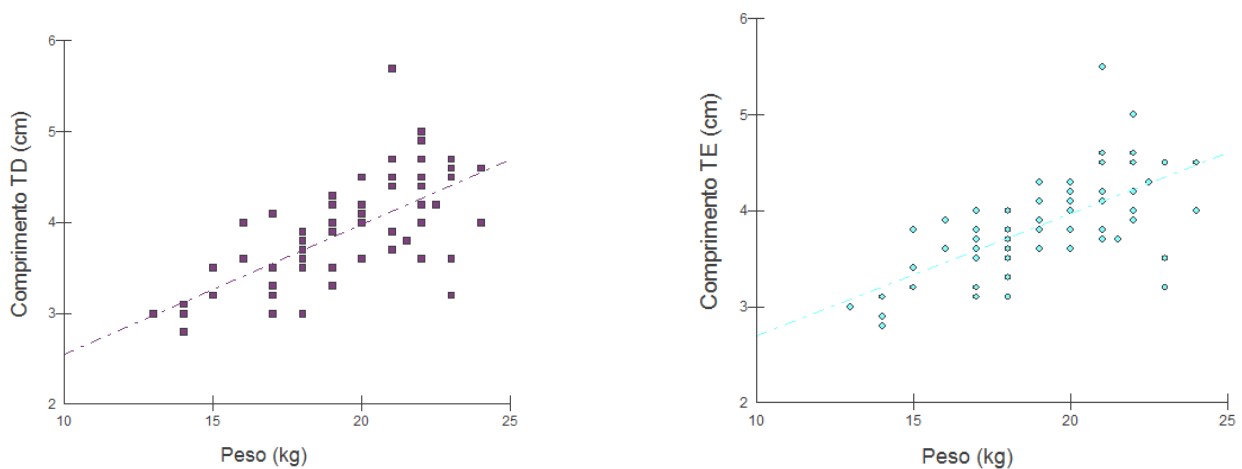


Gráfico 2- Correlação entre peso e comprimentos dos testículos direito e esquerdo de machos da espécie *Tayassu tajacu*.



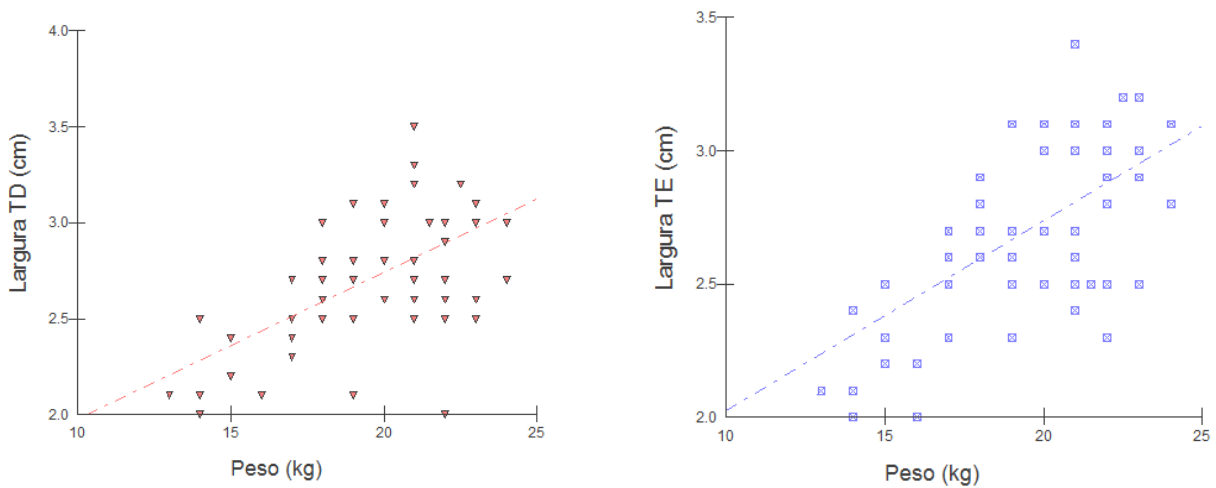


Gráfico 3- Correlação entre peso e larguras dos testículos direito e esquerdo de machos da espécie *Tayassu tajacu*.

A correlação estabelecida entre as variáveis de peso e comprimento, peso e largura, indicam que apesar desses parâmetros estarem relacionados, a variação de peso corpóreo pode não ter sido capaz de influenciar bruscamente nas dimensões gonadais dos animais avaliados durante o período experimental, pois as correlações de média intensidade ocorreram em função dos animais estarem na fase adulta e apresentarem estabilidade com relação ao desenvolvimento ponderal (Gráfico 4). Além disso, as constantes práticas de manejo não permitiram que ocorressem bruscas variações de peso corpóreo, capazes de alterar, de forma evidente, o comprimento e a largura dos testículos.

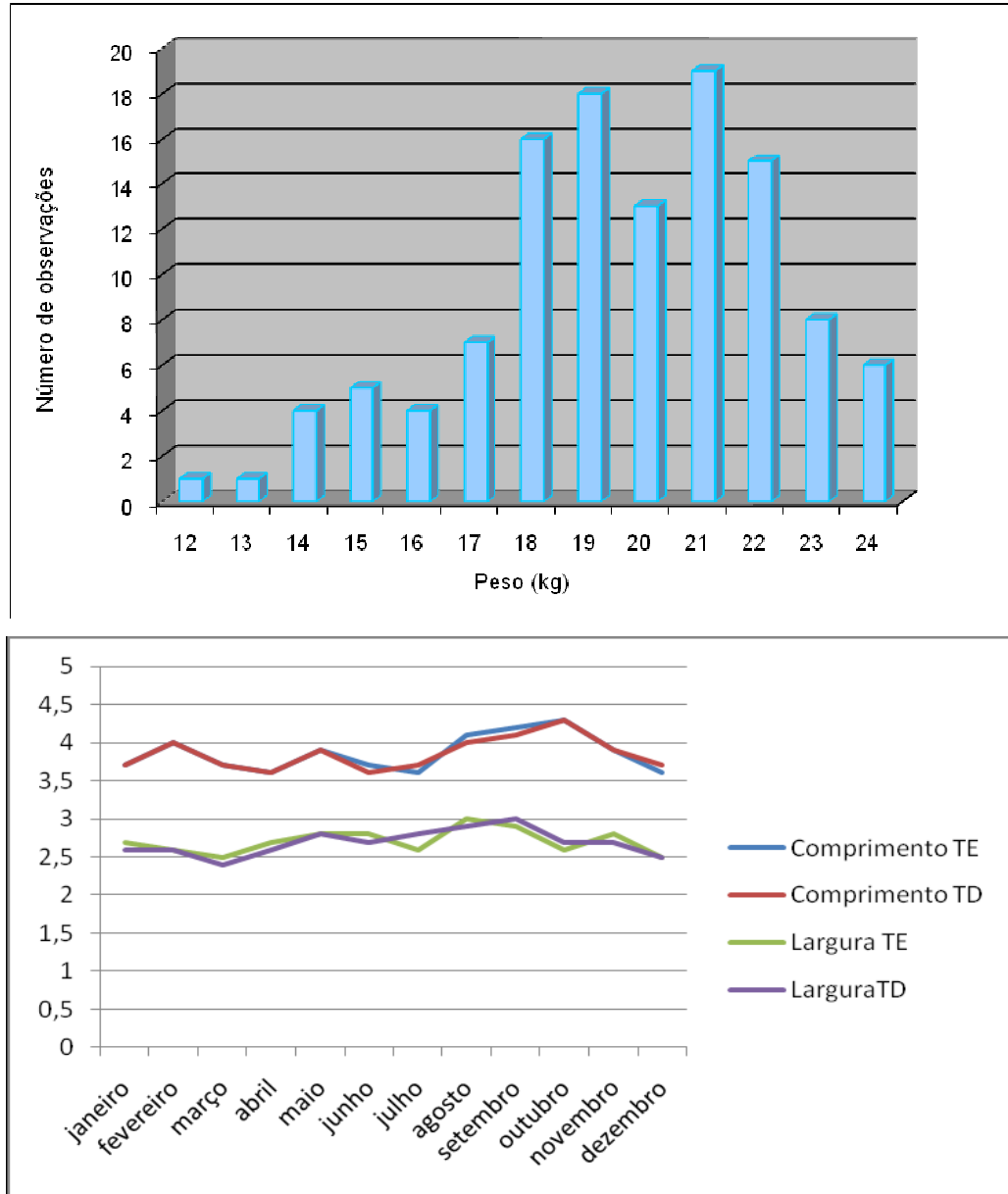


Gráfico 4- Distribuição da frequência do peso corpóreo observado e variação de comprimento e largura testiculares de caítus mantidos em cativeiro, ao longo do ano.

## 5.2 EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE ELETROEJACULAÇÃO

Das 117 tentativas de colheita de sêmen por eletroejaculação, 88 amostras apresentaram espermatozoides. Ou seja, houve sucesso na colheita em 75,21% das tentativas (88/117) e insucesso em 24,79% delas (29/117). Foram consideradas tentativas sem sucesso aquelas em que os animais não ejacularam (24 amostras) e aquelas em que somente a fração gel (4 amostras) ou líquido seminal (1 amostra) foram obtidos.

Em 9,4% das amostras colhidas houve contaminação por urina (11 amostras) e, portanto, foram desconsideradas para a avaliação dos parâmetros andrológicos. Morato et al.

(1998), ao avaliarem sêmen obtido por eletroejaculação em onças, observaram que 3,7% das amostras eram contaminadas com urina. Okano, Murase e Tsubota, (2004) observaram contaminação por urina em 100% das amostras seminais obtidas de ursos (*Ursus thibetanus japonicus*). No entanto, Busso et al. (2003) ao utilizarem a eletroejaculação em chinchilas (*Chinchilla lanigera*), obtiveram amostras seminais totalmente livre de urina, tanto em animais anestesiados, quanto em animais conscientes. A causa da contaminação por urina pode estar relacionada ao posicionamento mais cranial do eletrodo do eletroejaculador, já que a inervação controladora da micção está muito próxima da inervação controladora da ejaculação, e o aprofundamento do eletrodo no momento da ejaculação pode ocasionar a micção (MARTIN, 1978).

Outro importante aspecto a ser considerado para a colheita de sêmen é a anatomia da genitália externa do caítitu, pois a porção final do prepúcio forma uma espécie de divertículo com pequeno orifício que, associado ao formato em espiral da glândula peniana, ocasiona o enrolamento da mesma e a contenção do pênis, favorecendo a ejaculação dentro da bainha prepucial. No presente estudo, 10,25% das tentativas resultaram em ejaculados que ficaram retidos no prepúcio (12 amostras), impedindo a avaliação destas amostras, mesmo quando retiradas manualmente após massagem prepucial. Como alternativa, Fischman et al. (2003) exteriorizaram os pênis de javalis, previamente à colheita, com auxílio de pinça cirúrgica, favorecendo a obtenção e avaliação do ejaculado.

Em 20,52% das tentativas de colheita (24 amostras), os animais não ejacularam, estando de acordo com os achados de Moreira et al. (2005), que ao testarem este método em queixadas (*Tayassu peccari*), obtiveram amostra seminal somente em animal com maior peso. Esse resultado pode estar associado à resistência individual à estimulação por corrente elétrica (HARON et al., 2000), à insuficiente estimulação elétrica aos órgãos do aparelho reprodutor (RODGER e POLLITT, 1981) ou ao indevido posicionamento do eletrodo no assoalho pélvico. A síntese sobre a eficiência da eletroejaculação como técnica para obtenção de ejaculados em *Tayassu tajacu* pode ser observada no Gráfico 5.

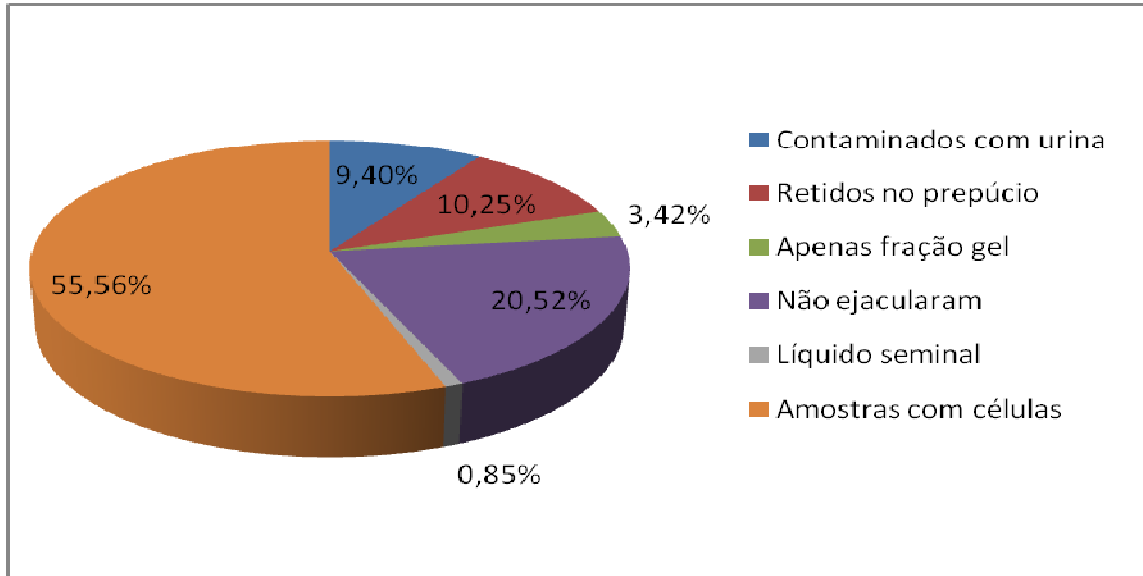


Gráfico 5- Eficiência na obtenção de ejaculados a partir do protocolo de eletroejaculação testado em machos da espécie *Tayassu tajacu* (117 amostras).

A análise das amostras colhidas com células (65 amostras) demonstrou que o sêmen de caititus pode apresentar três frações: uma pobre (constituída de secreção das glândulas acessórias e pobre em células), uma rica (onde está a maior parte das células espermáticas) e uma fração gel. Esses resultados estão de acordo com os achados de Lochmiller et al. (1985), Hellgren et al. (1989) e Costa e Paula (2005).

O peso médio em gel emitido pelos animais foi de  $0,58 \pm 0,33$  g, sendo que a fração gel foi obtida em apenas 3,42% das tentativas de colheitas (4 amostras). Ao colher sêmen de 10 caititus adultos, Souza et al. (2009) só observaram a fração gel em apenas dois animais, sugerindo ejaculação incompleta. A baixa porcentagem da fração gel nas amostras ocorreu em função da colheita ter sido direcionada somente para obtenção das frações com células, pois na metodologia adotada a sessão de estímulos foi interrompida ao serem emitidas as primeiras gotas de gel. Isso foi realizado porque o gel dificulta a avaliação dos parâmetros celulares, por promover a aglutinação das cabeças dos espermatozóides (LOCHMILLER et al., 1985).

Em apenas uma amostra (0,85%) houve colheita somente de líquido seminal, fator que pode estar associado a estímulo somente das glândulas acessórias do animal, visto que a maioria das amostras obtidas do animal apresentava células móveis. Giuliano et al. (2007) observaram azoospermia em 1,8% das amostras seminais obtidas através da eletroejaculação em lhamas (*Lama glama*).

### 5.3 CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CAITITUS MANTIDOS EM CATIVEIRO NA AMAZÔNIA ORIENTAL

#### 5.3.1 Exames Imediatos (aspecto, cor, volume total, pH, motilidade e vigor espermáticos)

Das 65 amostras com células, em 50 (76,93%) o aspecto do sêmen foi ralo, de cor esbranquiçada, caracterizando baixa concentração espermática. No entanto, um pequeno número de amostras (15 amostras = 23,07%) apresentou aspecto leitoso e cor branca, o que está associado com alta celularidade. As características seminais observadas durante o período experimental estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3- Características seminais de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* obtidas por eletroejaculação (65 amostras). Belém-PA, 2009.

	Vol. (mL)	Conc. (x10 <sup>6</sup> sptz/mL)	Mot. (%)	Vig. (0-5)	Viab. (%)	Def. Maior (%)	Def. Menor (%)	Def. Totais (%)
<b>Média±DP</b>	0,8±0,8	138,1±154,0	52,8±29,1	2,1±0,8	55,4±28,6	22,6±13,1	9,6±7,2	31,9±13,5
<b>Mínimo</b>	0,1	2,3	0	0	0	4,5	1	10,5
<b>Máximo</b>	5,0	647,5	90,0	3,0	94,0	57,0	30,0	70,5
<b>Amplitude</b>	4,9	645,2	90,0	3,0	94,0	52,5	29,0	60,0

O volume médio encontrado foi de 0,8±0,8mL, menor que os volumes de 1,3±1,1 mL verificados por Lochmiller et al. (1985), de 1,1±0,1 mL (fração clara mais a fração rica em células) observado por Hellgren et al. (1989), de 3,11±0,9 mL detectado por Costa e Paula (2005) e de 2,5±2,8 encontrado por Souza et al. (2009), sob ação anestésica com uso do propofol.

O pequeno volume ejaculado obtido neste estudo pode ser decorrente da permanência dos machos estudados junto às fêmeas em atividade reprodutiva, havendo a possibilidade de cópula previamente à colheita, associada à frequência quinzenal de colheitas. Volumes maiores obtidos por Lochmiller et al. (1985), Hellgren et al. (1989) e Souza et al. (2009) podem ter ocorrido por manterem seus animais experimentais isolados, tendo apenas contato visual ou olfatório com fêmeas em atividade reprodutiva, e sendo submetidos mensalmente à eletroejaculação. Além disso, as semelhanças fisiológicas e anatômicas do trato reprodutivo de caítilus com os dos suínos sugerem que caítilus podem produzir maior quantidade de volume seminal do que o observado no presente trabalho, uma vez que Solws (1984) afirma

que uma grande quantidade de sêmen pode ser observada na genitália externa de fêmeas após a cópula. Outra possibilidade seria decorrente do método de colheita usado, uma vez que, igualmente ao observado no presente trabalho, ejaculados de suínos domésticos colhidos com auxílio de eletroejaculadores são caracterizados por um pequeno volume de gel (menos que 5,0 mL/ejaculado) e um baixo volume de líquido seminal (VERA CRUZ, 1959). Fischman et al. (2003), ao realizarem colheita de sêmen por eletroejaculação em javalis, encontraram volume médio de  $15,5 \pm 8,8$  mL, considerado pequeno ao comparar com o volume produzido por suínos, espécie de porte semelhante. De acordo com Costa e Paula (2005), o volume reduzido não interfere na motilidade e na morfologia espermática, assegurando a eficiência do método na obtenção de amostras para avaliações andrológicas.

O pH médio seminal obtido foi de  $7,92 \pm 0,73$ , sendo o valor mínimo observado de 7,0 e o valor máximo de 9,0, com a amplitude de 2,0. Diferentemente, Costa e Paula (2005) observaram que o pH do sêmen de caítilus com idade entre 10 a 18 anos pode variar de  $6,2 \pm 0,2$  a  $7,6 \pm 0,1$ , enquanto que Souza et al. (2009) verificaram pH entre  $7,7 \pm 0,5$  a  $8,1 \pm 0,4$  em caítilus adultos. Barros et al. (2008a) ao colher sêmen de quatis (*Nasua nasua*) verificou pH de  $7,9 \pm 0,6$ . Austin; Hupp; Murphree (1961) encontraram pH médio de 7,3 em sêmen de touros colhidos por eletroejaculação, valor considerado elevado para espécie.

A obtenção de valores elevados para pH, através da eletroejaculação, pode ser atribuída à maior quantidade de líquido seminal provenientes das glândulas bulbouretrais, que produzem pouca quantidade de frutose (AUSTIN; HUPP; MURPHREE, 1961). Martinez et al. (2008), ao comparar amostras do epidídimo e eletroejaculadas em cervo (*Cervus alopheus*), observaram valores de pH mais elevados para amostras obtidas por eletroejaculação (7,63 versus 6,28), e atribuíram essa diferença às modificações na produção do plasma seminal, relacionadas ao aumento da idade do macho estudado. Esta pode também ocorrer devido à variação individual concernentes à composição química do ejaculado (KOMMISRUD et al., 2002).

A motilidade espermática média observada no presente estudo foi de  $52,8 \pm 29,1\%$ , sendo mais elevada que os achados de Lochmiller et al. (1985), que encontraram  $49,5 \pm 15,8\%$  e Costa e Paula (2005), que detectaram motilidade de  $48,7 \pm 31,5\%$  em caítilus. No entanto, Hellgren et al. (1989) observaram motilidade média de  $57 \pm 15\%$ , com variação individual de 5% a 90%, sendo esta última similar à variação geral encontrada neste estudo, que foi de 0 a 90%. Já Souza et al. (2009) verificaram motilidade média de  $55 \pm 31,1\%$  em caítilus sob ação da tiletamina-zolazepam e  $85 \pm 8,0\%$  com uso de propofol. No presente trabalho, em 24,61% dos ejaculados, a motilidade espermática foi maior que 70%. O vigor médio observado no

presente estudo foi de  $2,1 \pm 0,8$ , sendo este valor similar ao encontrado por Costa e Paula (2005) que verificaram vigor de  $2,1 \pm 1,4$  para caimitus criados em cativeiro.

### 5.3.2 Avaliação da Concentração Espermática

A concentração espermática média encontrada foi de  $138,1 \pm 154,1 \times 10^6$  spz/mL, valor inferior aos observados por Lochmiller et al. (1985), que detectaram concentração de  $354 \pm 173 \times 10^6$  spz/mL. Já Costa e Paula (2005) observaram concentração de  $87,0 \pm 53,1 \times 10^6$  spz/mL, em caimitus idosos e com quadro de degeneração testicular, enquanto Souza et al. (2009) encontraram concentração de  $13,8 \pm 5,7$  a  $118 \pm 158,4 \times 10^6$  spz/mL. Hellgren et al. (1989) observaram variação mensal de  $132 \pm 22 \times 10^6$  spz/mL a  $828 \pm 204 \times 10^6$  spz/mL ao avaliarem sêmen de caimitus. A variação de concentração encontrada, no presente estudo, foi de 2,38 a  $647,5 \times 10^6$  spz/mL.

A concentração média encontrada foi relativamente baixa, pois em 32 amostras (49,23%) a concentração foi menor que  $100 \times 10^6$  spz/mL, o que pode também estar relacionado com o método de colheita utilizado, pois a eletroejaculação possibilita maior estimulação das glândulas acessórias e obtenção maior volume e menor concentração, além da frequência de colheita, possíveis cópulas progressas e status social do animal estudado - dominante ou subordinado (Hellgren et al. 1989).

Também houve ejaculados que apresentaram celularidade muito maior à média obtida. Portanto, presume-se que a concentração seminal fisiológica de caimitus adultos, em idade reprodutiva, pode apresentar valores variáveis, a qual poderia ser melhor avaliada com método de colheita manual. Costa e Paula (2005) encontraram variação neste parâmetro de  $11,8 \pm 2,5 \times 10^6$  spz/mL a  $144,3 \pm 19,8 \times 10^6$  spz/mL, mas os animais experimentais sofriam a influência da idade e constante estresse, pois eram animais mantidos em cativeiro de zoológico.

### 5.3.3 Avaliação de Viabilidade e Morfologia Espermáticas

A viabilidade espermática média encontrada foi de  $55,4 \pm 28,6\%$ , sendo este menor que os achados de Evans e Ko (1990), que observaram ejaculados de porcos miniaturas com 93% de células viáveis, e dos relatos de Fischman et al. (2003), que avaliaram ejaculados com  $84 \pm 10\%$  de células vivas em javalis. Barros et al. (2008b) observaram  $54,9 \pm 25,4\%$  de células vivas em sêmen de tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*). Já Souza et al. (2009) encontraram

viabilidade espermática variando de  $74,3\pm 35$  a  $83,9\pm 7,0\%$  em caimitus, mais elevada que o encontrado no presente estudo.

A média de defeitos maiores encontrada foi de  $22,6\pm 13,1\%$ , mais elevada que os achados de Lochmiller et al. (1985), que detectaram apenas  $7,27,2\pm 5,9\%$  em caimitus. No entanto, esses autores detectaram elevado número de defeitos menores ( $64,4\pm 15,2\%$ ), estando em desacordo com a média encontrada no presente estudo, que foi de  $9,11\pm 5,88\%$ . A média de defeitos totais encontrada foi de  $31,9\pm 13,5\%$ , menor que a média encontrada por Mollinea; Adogwa; Garcia (2007) ao avaliar sêmen de cutias (*Dasyprocta leporina*), que verificaram  $35,14\pm 2,76\%$  de anormalidades totais. Já Costa e Paula (2005) observaram variação de defeitos totais entre  $15,5\pm 2,4\%$  e  $55,5\pm 16,1\%$  em caimitus adultos. Segundo Mies Filho (1987), animais silvestres mantidos em cativeiro podem apresentar elevadas porcentagens de células morfologicamente anormais, se comparadas às espécies domésticas. Essa taxa elevada pode estar associada ao regime de cativeiro e constante estresse aos quais os animais são submetidos. Morato et al. (1998) detectou em machos da espécie *Panthera onca* mantidos em cativeiro alto percentual de anormalidades espermáticas, que poderiam estar associado a fatores genéticos, nutricionais e ambientais. Os defeitos espermáticos maiores mais observados foram em média  $9,9\pm 12,0\%$  de cauda fortemente dobrada ou enrolada,  $5,1\pm 5,7\%$  de acrossoma e  $4,2\pm 4,2\%$  de gota protoplasmática proximal. Os defeitos menores mais observados foram  $5,5\pm 6,8\%$  de gota protoplasmática distal e  $1,4\pm 1,9\%$  de inserção abaxial.

#### 5.3.4 Correlações entre Características Seminais e Biometria Testicular

O grau de associação entre os parâmetros testiculares e as características físicas do ejaculado podem ser observados na Tabela 4. Foram observadas correlações negativas, de baixa intensidade e não significativas entre peso, parâmetros testiculares e características seminais, resultados semelhantes aos achados por Viu et al. (2006), que encontraram correlações baixas, negativas e sem significância entre biometria testicular e características seminais de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Diferentemente, Minter e De Liberto (2008) observaram correlações positivas e significativas entre volume testicular e volume do ejaculado ( $r=0,679$ ,  $P<0,001$ ), volume testicular e concentração ( $r=0,499$ ,  $P<0,001$ ) motilidade e viabilidade espermáticas ( $r=0,589$ ,  $P<0,001$ ) e volume testicular e defeitos ( $r=0,469$   $P<0,001$ ) de sêmen de coiotes (*Canis latrans*).



Tabela 4- Correlações entre peso corpóreo, parâmetros testiculares e características seminais de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* criados em cativeiro. Belém-PA, 2009.

	<b>Vol (mL)</b>	<b>Conc (x10<sup>6</sup>sptz/mL)</b>	<b>Mot (%)</b>	<b>Vig (0-5)</b>	<b>Viab (%)</b>	<b>Def. Totais (%)</b>
<b>Peso</b>	-0,2485	0,1700	-0,1648	-0,0636	-0,1360	-0,0411
<b>Comp TE</b>	-0,2087	0,1398	-0,0541	-0,0954	-0,0349	-0,1277
<b>Larg TE</b>	-0,3264	0,3866	-0,1829	-0,0248	-0,1573	-0,0731
<b>Cons TE</b>	0,0431	0,0558	-0,0361	-0,0896	-0,0352	-0,2421
<b>Comp TD</b>	-0,1593	0,1483	-0,0651	-0,0900	-0,0512	-0,1298
<b>Larg. TD</b>	-0,3000	0,3760	-0,2610	-0,0738	-0,2463	-0,0814
<b>Cons TD</b>	0,0272	0,0909	-0,0107	-0,0566	-0,0071	-0,2495

\* P<0,001

As correlações observadas entre as características seminais estão indicadas na Tabela 5. Foram identificadas relações altamente significativas entre motilidade espermática e vigor ( $r= 0,820$ ,  $P<0,0001$ ), motilidade e células vivas ( $r= 0,983$ ,  $P<0,0001$ ) e entre vigor e células vivas ( $r=0,802$ ,  $P<0,001$ ). A íntima relação entre a motilidade progressiva, vigor e porcentagem de células vivas estabelece maior acurácia no julgamento da viabilidade seminal e efetiva aplicabilidade do ejaculado. Esses parâmetros são fortes indicadores que denotam a capacidade de movimentação celular, integridade de membrana e atividade metabólica, os quais estão relacionados à fertilidade, uma vez que baixas motilidades espermáticas refletem negativamente na fertilização e taxa de concepção (BRITT ALMOND; FLOWERS, 1999).

Tabela 5- Correlações entre as características seminais de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* criados em cativeiro. Belém-PA, 2009.

	<b>Vol</b> (mL)	<b>Conc</b> (x10 <sup>6</sup> sptz/mL)	<b>pH</b>	<b>Mot</b> (%)	<b>Vig</b> (0-5)	<b>Viab</b> (%)	<b>Def</b> <b>Maiores</b> (%)	<b>Def</b> <b>Menores</b> (%)	<b>Def</b> <b>Totais</b> (%)
<b>Vol</b>	1								
<b>Conc</b>	-0,279	1							
<b>pH</b>	0,216	-0,086	1						
<b>Mot</b>	-0,167	0,226	-0,292	1					
<b>Vig</b>	-0,167	0,391	-0,322	0,820*	1				
<b>Viab</b>	-0,182	0,203	-0,295	0,983*	0,802*	1			
<b>Def</b> <b>Maiores</b>	0,280	-0,013	0,280	-0,644*	-0,538	-0,652*	1		
<b>Def</b> <b>Menores</b>	-0,036	0,226	0,023	0,294	0,289	0,275	-0,196	1	
<b>Def Totais</b>	-0,254	0,097	0,273	-0,484	-0,832*	-0,501	0,877*	0,297	1

\* P<0,001

Vale ressaltar a correlação negativa significativa observada entre motilidade e defeitos maiores ( $r = -0,644$ ,  $P < 0,0001$ ), a qual pode ser um indicativo de que os defeitos maiores mais freqüentes no sêmen de caititus, levando em consideração as condições de colheita e processamento das amostras, sejam as patologias relacionadas à cauda e/ou à peça intermediária, que interferem diretamente na capacidade de movimentação celular e, conseqüentemente, reduzem a motilidade espermática.

#### 5.4 PERFIL SEMINAL AO LONGO DO ANO

Ao analisar o comportamento de motilidade e células viáveis (Gráfico 6), defeitos maiores, menores e totais (Gráfico 7) ao longo dos meses do ano, observou-se que ocorreram menores valores nos parâmetros seminais, principalmente entre os meses de março a maio, com redução da motilidade e viabilidade, e concomitante aumento no total de defeitos espermáticos. No período de março a maio, a motilidade espermática média foi de  $40,1 \pm 4,0\%$ , o vigor médio foi de  $2,0 \pm 0,0$ , a viabilidade média foi de  $41,9 \pm 3,3\%$ , a média de defeitos maiores foi de  $27,4 \pm 7,7\%$ , a média de defeito menores foi de  $11,2 \pm 1,7\%$  e de defeitos totais foi de  $38,5 \pm 9\%$ . A menor qualidade seminal observada entre março e maio pode ter ocorrido

em função do período pós-parto das fêmeas, que, segundo Mayor et al. (2007b), se estende por 60 dias aproximadamente, e coincide com o período supracitado. A queda na qualidade seminal foi observada em todos os indivíduos, entre março a maio, porém, com intensidades diferentes. Por outro lado, entre setembro e outubro, houve aumento da qualidade seminal, com maiores níveis de motilidade, vigor e viabilidade.

A variação nos parâmetros seminais pode ocorrer em função de fatores ambientais (temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade, estresse, precipitação pluviométrica), nutricional e fatores intrínsecos ao indivíduo (repouso sexual, enfermidades, estresse pelo manejo, entre outros), os quais podem interferir na atividade reprodutiva. No entanto, com base nos resultados observados, não é possível afirmar que as mudanças ambientais tiveram magnitude suficiente a ponto de indicar sazonalidade na produção seminal de *caititus* mantidos em cativeiro. Durante o ano, as médias de motilidade variaram de 35,5% a 63,3%, o vigor variou de 1,7 a 2,6, a viabilidade variou de 39,5% a 68,6%. A variação para defeitos maiores, menores e totais foi de 18,7% a 34,5%, 5,6% a 15,6% e 27,0% a 47,5%, respectivamente. Esses resultados corroboram os achados de Hellgren et al. (1989), que ao avaliarem sazonalidade em animais de cativeiro, concluíram que o macho adulto pode ser fértil o ano todo, mesmo que haja diminuição das concentrações de testosterona sérica durante o verão.

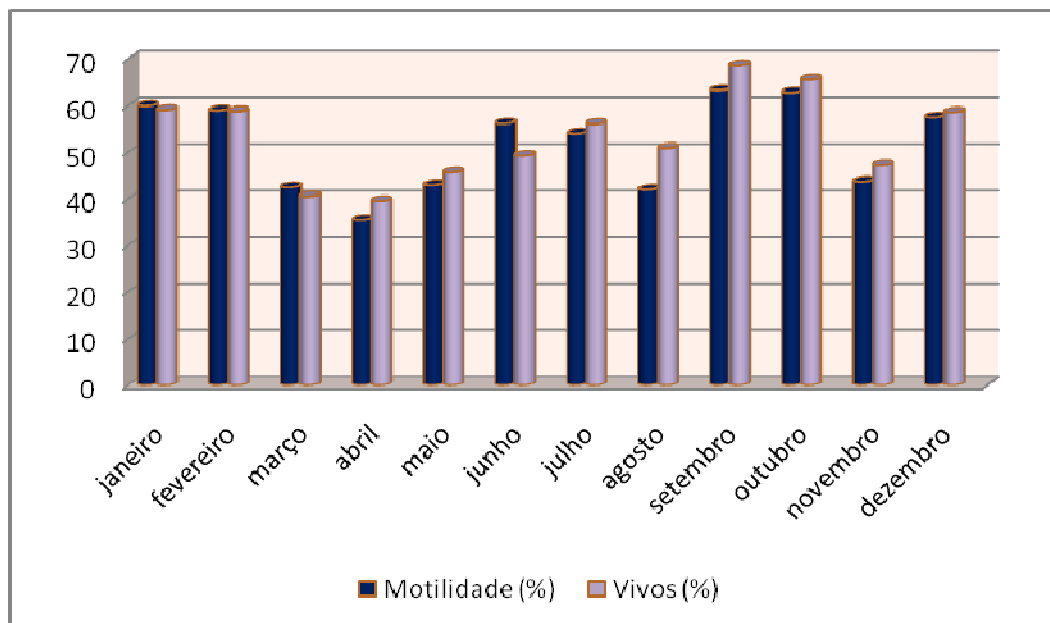


Gráfico 6- Variação mensal da motilidade e viabilidade espermiáticas em sêmen de *Tayassu tajacu*, para machos em idade reprodutiva mantidos em cativeiro.

Um dos indicadores de fertilidade de rebanhos é a taxa anual de parição. No mesmo criatório científico onde foi desenvolvido o presente estudo, Mayor et al. (2007b) observaram que a concentração dos partos de *caititus* ocorre entre os meses de janeiro e março. Uma vez que, segundo Mayor et al. (2007b), a gestação em *caititus* tem duração média de 138 dias (aproximadamente 5 meses), maior número de gestações se inicia entre os meses de setembro e outubro, período que coincide com os meses de melhor qualidade seminal observados neste experimento. Entre os meses de setembro e outubro, a motilidade média verificada foi de  $63,0 \pm 0,3\%$ , o vigor médio foi de  $2,0 \pm 0,0$ , a média de células viáveis foi de  $67,1 \pm 2,0\%$ , a média de defeitos maiores foi de  $20,6 \pm 0,5\%$ , a média de defeitos menores foi de  $9,6 \pm 4,7\%$  e os defeitos totais médios foram de  $29,4 \pm 5,02\%$ .

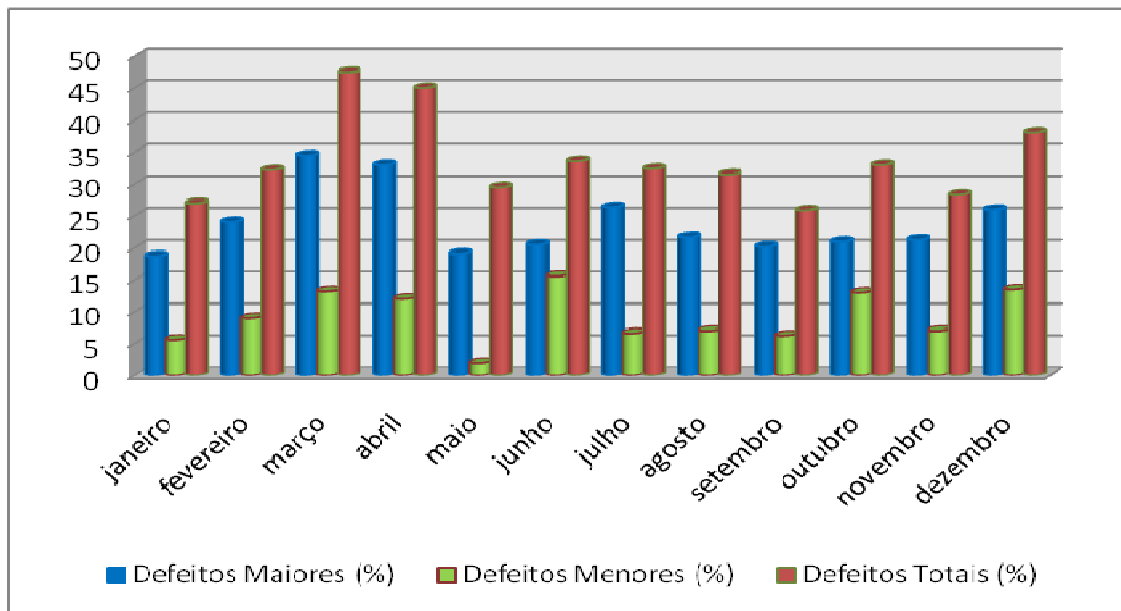


Gráfico 7- Variação mensal de defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais em sêmen de *Tayassu tajacu*, para machos em idade reprodutiva mantidos em cativeiro.

Considerando a influência das condições climáticas na produção e qualidade de ejaculados, as características seminais observadas foram agrupadas e observadas levando em consideração o período mais chuvoso e menos chuvoso do ano, observadas na Tabela 6 e na Tabela 7. Não foram observadas diferenças significativas entre concentração, pH, motilidade, vigor, vivos e defeitos espermáticos avaliados nos períodos mais chuvoso e menos chuvoso (Gráfico 8). Somente o volume apresentou diferença significativa ( $P= 0,008$ ); no entanto, essa característica é variável em função do método de colheita adotado que pode ocasionar

variação de respostas aos estímulos elétricos, entre os indivíduos e entre as colheitas (AUSTIN; HUPP; MURPHREE, 1961).

Tabela 6- Características físicas (média±DP) do sêmen de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* observadas no período mais chuvoso e menos chuvoso. Belém-PA, 2009.

Características Seminais	Período Mais Chuvoso (dezembro a maio)	Período Menos Chuvoso (junho a novembro)	P
<b>Volume (mL)</b>	0,75±0,5 <sup>a</sup>	0,3±0,6 <sup>b</sup>	0,008
<b>Concentração (x10<sup>6</sup>sptz/mL)</b>	109,8±95,7 <sup>a</sup>	167,2±185,0 <sup>a</sup>	0,154
<b>pH</b>	7,8±0,6 <sup>a</sup>	7,8±0,7 <sup>a</sup>	1,000
<b>Motilidade (%)</b>	55,1±28,9 <sup>a</sup>	53,5±28,5 <sup>a</sup>	0,828
<b>Vigor</b>	2,3±0,9 <sup>a</sup>	2,0±0,7 <sup>a</sup>	0,130
<b>Viabilidade (%)</b>	56,1±28,8 <sup>a</sup>	56,6±28,8 <sup>a</sup>	0,940

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

Temperatura e umidade elevadas, características do clima amazônico, podem levar o animal ao estresse térmico, especialmente se acompanhadas por uma ampla flutuação da temperatura, resultando em diminuição na ingestão de alimento e transferência da energia para manutenção da homeostase, acarretando interferência na espermatogênese (KUNAVONGKRIT et al., 2005).

Tabela 7- Defeitos espermáticos (média±DP) observados em sêmen de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* no período mais chuvoso e menos chuvoso. Belém-PA, 2009.

Defeitos Espermáticos	Período Mais Chuvoso (dezembro a maio)	Período Menos Chuvoso (junho a novembro)	P
<b>Defeitos Maiores (%)</b>	23,7±14,0 <sup>a</sup>	21,7±12,7 <sup>a</sup>	0,569
<b>Defeitos Menores (%)</b>	9,6±7,7 <sup>a</sup>	8,6±5,7 <sup>a</sup>	0,567
<b>Defeitos Totais (%)</b>	33,3±13,5 <sup>a</sup>	30,3±13,7 <sup>a</sup>	0,407

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

Apesar dos rigores inerentes ao clima amazônico, a pequena variação na qualidade seminal pode ser explicada pela adaptação da espécie ao clima, uma vez que o caititu é capaz de viver nos mais diversos *habitats*, desde florestas tropicais úmidas até savanas e desertos (SOLWS, 1984). Essa peculiaridade da espécie, associada às condições controladas de

manejo nutricional e sanitário realizadas em cativeiro, possibilitam a produção relativamente homogênea de sêmen, garantindo a capacidade reprodutiva dos indivíduos durante o ano todo. Os resultados do presente trabalho divergem dos achados Suriyasomboon et al. (2005), que verificaram que a estação do ano e elevadas temperaturas e umidade influenciam negativamente na morfologia espermática, elevando a incidência de gotas citoplasmáticas proximais, em virtude da alteração do epitélio seminífero, em suínos da raça Duroc.

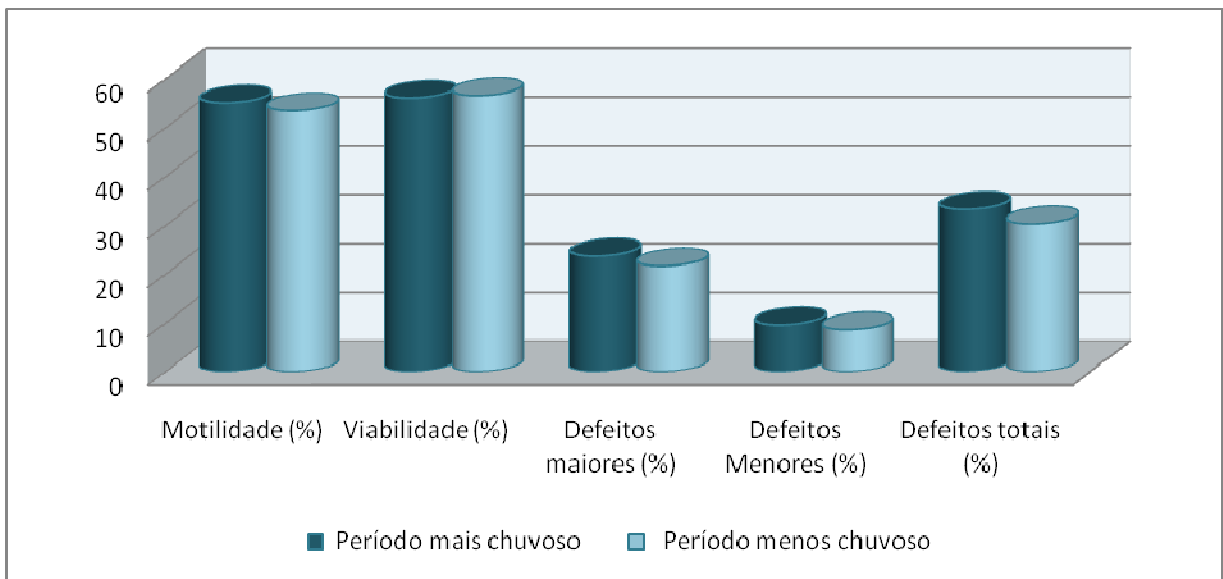


Gráfico 8- Características seminais de machos da espécie *Tayassu tajacu*, observadas nos períodos mais chuvoso e menos chuvoso do ano.

Durante as avaliações seminais, foram identificadas variações entre indivíduos com relação à produção e à qualidade do ejaculado, como pode ser observado nas Tabela 8 e Tabela 9. Essas diferenças poderiam ser utilizadas como critério para a seleção de machos férteis, que apresentem maior potencial, tanto para a criopreservação quanto para a produção de embriões, uma vez que o sucesso do desenvolvimento e sobrevivência dos embriões depende também de contribuições genéticas e epigenéticas dos machos (DURANTHON e RENARD, 2001). Foram observadas características seminais indicativas de baixa fertilidade apenas para o indivíduo D, que apresentou motilidade média de  $18,2 \pm 20,5\%$ , vigor médio de  $1,1 \pm 0,6$ , viabilidade média de  $20,6 \pm 23,2\%$ , defeitos maiores médios de  $43,1 \pm 12,6\%$ , defeitos menores médios de  $7,7 \pm 4,1\%$  e defeitos totais de  $50,9 \pm 14,3\%$ . Semelhantemente, Castro et al. (1996) identificaram variações entre os suínos da raça Duroc avaliados, destacando um indivíduo com baixa motilidade ( $31,2 \pm 0,2\%$ ) e elevado número de defeitos espermáticos

(60,6±10,0%). Visando maior fertilidade e prolificidade, animais nessas condições deveriam ser desconsiderados como doadores em programas de inseminação artificial.

Tabela 8- Características físicas seminais (média±DP) de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. Belém-PA, 2009.

<b>Animais</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Concentração (x10<sup>6</sup>sptz/mL)</b>	<b>pH</b>	<b>Motilidade (%)</b>	<b>Vigor</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
<b>A</b>	1,0±1,0	160,1±169,3	7,7±1,1	45,0±27,8	2,1±0,9	45,9±23,7
<b>B</b>	0,2±0,2	187,4±86,6	7,3±0,5	61,6±10,4	3,0±0,0	66,3±13,7
<b>C</b>	0,9±1,3	296,3±210,2	8,0±0,7	53,7±25,4	2,4±0,7	55,7±25,6
<b>D</b>	1,3±0,5	80,9±81,6	8,2±0,8	18,2±20,5	1,1±0,6	20,6±23,2
<b>E</b>	0,4±0,1	128,6±143,4	7,7±0,4	62,1±24,4	2,2±0,7	64,7±23,3
<b>F</b>	0,3±0,3	109,2±132,4	7,3±0,5	48,8±35,8	2,1±0,8	53,2±35,1
<b>G</b>	1,3±0,9	46,9±33,4	8,2±0,5	82,2±5,6	2,7±0,4	83,1±5,8
<b>H</b>	0,4±0,2	89,2±74,0	8,2±0,5	62,1±24,1	2,0±0,5	66,0±23,3

Por outro lado, foi possível observar que o animal G apresentou elevada qualidade seminal, característica que o tornaria apto para reprodução e doador em potencial para programas de reprodução assistida, baseado em padrões seminais definidos para animais domésticos, como o suíno (CBRA, 1998). Esse animal apresentou motilidade espermática média de 82,2±5,6%, vigor médio de 2,7±0,4, viabilidade média de 83,1±5,8%, defeitos maiores médios de 13,3±4,0%, defeitos menores médios de 9,1±3,7% e defeitos totais médios de 22,5±4,9%, características que o tornariam elegível inclusive para um programa tentativo de congelamento seminal.

Tabela 9- Defeitos espermáticos (média±DP) observados em sêmen de machos adultos da espécie *Tayassu tajacu* mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. Belém-PA, 2009.

Animais	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
<b>A</b>	20,2±10,3	7,7±4,8	28,0±11,6
<b>B</b>	23,3±12,1	4,6±2,4	28,0±11,3
<b>C</b>	28,5±12,1	12,5±7,5	41,0±8,7
<b>D</b>	43,1±12,6	7,7±4,1	50,9±14,3
<b>E</b>	13,2±5,4	13,9±12,3	27,2±10,2
<b>F</b>	19,6±6,8	4,7±3,2	24,3±7,4
<b>G</b>	13,3±4,0	9,1±3,7	22,5±4,9
<b>H</b>	15,7±9,9	7,2±4,1	23,0±9,7

Características seminais como motilidade, morfologia espermática, integridade de acrossoma, viabilidade, quantidade de ATP e resistência ao estresse osmótico podem influenciar nas taxas de penetração de óocitos, nas taxas de fertilização e clivagem embrionária (COUROT e COLAS, 1986; GADEAL e MATAS, 2000). Flowers (2002) afirma que diferenças individuais em suínos relacionadas à produção de doses inseminantes podem interferir no tamanho da ninhada. Em humanos, anormalidades estruturais cromossômicas estão relacionadas aos abortos espontâneos, reforçando que o efeito do macho se estende a eventos subsequentes à fertilização, como desenvolvimento embrionário e sobrevivência fetal (MATEI, 1984), reforçando assim, a grande contribuição de machos na eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos. Características físicas e morfológicas de ejaculados associadas a fatores genéticos e à sanidade do animal são consideradas critério para a seleção de machos com aptidão reprodutiva (CBRA, 1998) e poderiam ser utilizadas também para seleção de caimitus em futuros programas de melhoramento e seleção.

Considerando que o caimitu é uma espécie silvestre sobre a qual há escassos estudos de fisiologia reprodutiva do macho, os resultados médios de motilidade (52,8±29,1), viabilidade espermática (55,4±28,6%) e defeitos totais (31,9±13,5%) obtidos por eletroejaculação, em protocolo de colheita de sêmen ainda em aperfeiçoamento, podem ser considerados indicadores favoráveis a uma potencial estocagem de sêmen da espécie. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho para sêmen a fresco podem representar o primeiro passo não só



para a conservação, mas também para o melhoramento de rebanhos que podem vir a ser inseminados artificialmente com sêmen criopreservado.

## 5.5 CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

### 5.5.1 Efeito do Diluidor na Manutenção da Sobrevivência Espermática

Para verificar a resistência espermática ao frio e ao tempo de estocagem, foram avaliados os parâmetros seminais em sêmen diluído com os diluidores BTS ou X-Cell®. Os dois diluidores testados foram de fácil preparo e possibilitaram adequada visualização dos espermatozoides. Na Tabela 10 e na Tabela 11 podem ser visualizadas as modificações ocorridas durante o tempo de estocagem em ejaculados diluídos com BTS ou X-Cell®.

Tabela 10- Características de ejaculados (média±DP, valor mínimo-valor máximo) de *Tayassu tajacu* diluídos em BTS, nos momento da diluição (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48) de conservação sob refrigeração. Belém-PA, 2009.

Tempo de Armazenamento	Motilidade (%)	Vigor	Viab (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)	pH
<b>T0</b>	56,1±17,6	2,3±0,4	60,2±17,2	18,5±10,2	10,0±4,4	28,1±10,8	8,0±0,0
	(30,0-80,0)	(2-3)	(32,0-82,5)	(5,5-54,0)	(3,0-18,0)	(14,0-62,0)	(8,0-8,0)
<b>T24</b>	17,9±23,3	0,9±0,9	27,9±23,8	28,2±11,5	9,2±4,4	37,5±12,1	8,2±0,4
	(0-70,0)	(0-3)	(0-69,5)	(7,5-66,0)	(7,5-19,0)	(19,5-70,5)	(8,0-9,0)
<b>T48</b>	7,7±19,6	0,3±0,6	11,7±20,2	31,5±11,82	9,7±4,0	41,28±11,4	8,31±0,47
	(0-70,0)	(0-2)	(0-69,0)	(13,5-69,0)	(3,5-18)	(25,5-74)	(8,0-9,0)

O sêmen diluído nos dois meios avaliados apresentou decréscimo significativo dos parâmetros de qualidade no decorrer dos dias de conservação, o que pôde ser observado pela redução da motilidade em aproximadamente 86% observada no tempo zero para sêmen diluído em BTS e 74% para sêmen diluído em X-Cell®, e aumento em aproximadamente 53% nos defeitos totais para BTS e 43% para X-Cell®. Não houve mudança significativa de pH durante o período de conservação. Esses resultados discordam dos achados de Estienne; Harper; Day, (2007) que observaram em sêmen de suínos pequena redução na motilidade espermática, de 93,2% para 88, 9% para BTS e de 93,2% para 90% para X-Cell®, somente após sete dias de estocagem sob 18°C.

Tabela 11- Características de ejaculados (média±DP, valor mínimo-valor máximo) de *Tayassu tajacu* diluídos em X-Cell®, nos momento da diluição (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48) de conservação sob refrigeração. Belém-PA, 2009.

<b>Tempo de Armazenamento</b>	<b>Motilidade (%)</b>	<b>Vigor</b>	<b>Viab (%)</b>	<b>Defeitos Maiores (%)</b>	<b>Defeitos Menores (%)</b>	<b>Defeitos Totais (%)</b>	<b>pH</b>
<b>T0</b>	54,2±22,1 (0-80,0)	2,3±0,6 (1-3)	57,8±21,7 (15,0-85,0)	21,1±10,2 (6,0-50,5)	9,6±4,57 (3,0-21,5)	30,8±11,2 (13,5-63,0)	7,0±0,0 (7,0-7,0)
<b>T24</b>	27,0±28,0 (0-80,0)	1,3±1,06 (0-3)	33,0±26,9 (0-80,0)	30,8±12,4 (14,0-61,0)	10,3±5,7 (2,0-23,5)	41,2±13,4 (23,5-74,0)	7,0±0,1 (7,0-7,5)
<b>T48</b>	14,0±24,2 (0-70,0)	0,61±0,8 (0-2)	19,9±25,6 (0-71,0)	33,0±13,5 (9,5-65,0)	11,1±6,5 (2,5-27,0)	44,2±14,4 (22,0-77,0)	7,0±0,1 (7,0-7,5)

Os resultados demonstraram a sensibilidade dos espermatozóides de caititus ao estresse provocado pela diluição, pelo processo de refrigeração e por possível limitação dos diluidores escolhidos para sua manutenção, uma vez que a conservação da capacidade fertilizante de espermatozóides depende da proteção contra o choque promovida pelo diluidor (WATSON e PLUMMER, 1985). Contudo, com base nos resultados das características seminais, é possível afirmar que até 24 horas de conservação sob 17°C, o sêmen de caititus pode apresentar potencial capacidade fertilizante. No entanto, há necessidade de estudos mais aprofundados que tenham como enfoque principal minimizar os efeitos prejudiciais da diluição, as injúrias provocadas pelo choque frio, além de estudos que elucidem aspectos importantes para escolha do melhor diluidor para espécie.

As comparações entre as médias das variáveis estudadas para cada diluidor testado estão sumarizadas na Tabela 12. Pôde-se constatar que não houve diferença significativa entre os diluidores testados com relação à manutenção dos parâmetros seminais durante o período de estocagem, muito embora o diluidor X-Cell® tenha apresentado os maiores valores médios para motilidade e viabilidade, enquanto o sêmen conservado com BTS apresentou menores porcentagens de defeitos (Gráfico 9). Estes resultados corroboram os achados de Estienne; Harper; Day, (2007), que não encontraram diferença significativa entre BTS (88,9%) e X-Cell® (90,7%) na manutenção da motilidade espermática em ejaculados de varrões durante setes dias de estocagem. São concordantes, também, com os resultados de Vyt et al. (2004), que não observaram grandes diferenças na manutenção de motilidade espermática, na porcentagem de células vivas e no vigor, para sêmen mantido em BTS e Kobidil (diluidores de curta duração), e Mulberry, Androhep e Acromax (diluidores de longa duração).

Tabela 12- Comparação entre médias de características do sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell®, durante 48 horas de conservação. Belém-PA, 2009.

Características Seminais	BTS	X-Cell®
Motilidade (%)	27,2 <sup>a</sup>	31,8 <sup>a</sup>
Vigor (0-5)	1,2 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>
Viabilidade (%)	33,3 <sup>a</sup>	36,9 <sup>a</sup>
Defeitos Maiores (%)	26,1 <sup>a</sup>	28,3 <sup>a</sup>
Defeitos Menores (%)	9,6 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>
Defeitos Totais (%)	35,6 <sup>a</sup>	38,7 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Características do diluidor podem estar relacionadas com a taxa de sobrevivência celular. Dentre elas, são citadas como importantes sua composição química, presença de íons, pH, osmolaridade, taxa e velocidade de diluição do sêmen e, principalmente, a temperatura no momento da diluição, que deve ser a mesma do sêmen. Essas características, associadas aos procedimentos laboratoriais de diluição, podem levar ao choque térmico e a lesões irreversíveis na membrana, mitocôndrias e DNA (KARABINUS; EVENSON; KAPROTH, 1991).

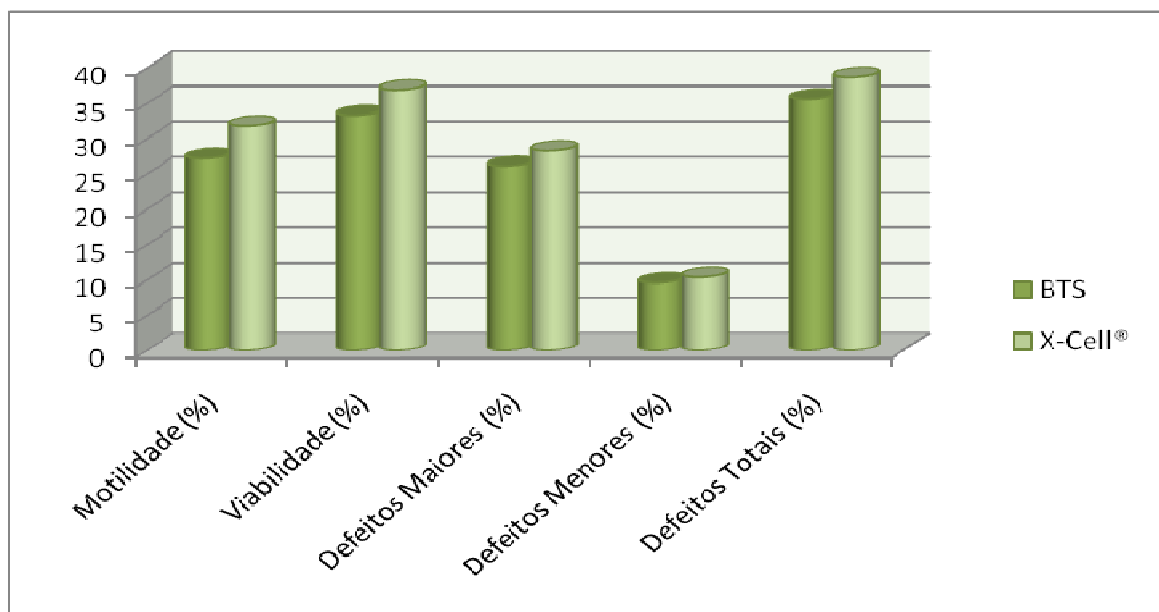


Gráfico 9- Características do sêmen de *Tayassu tajacu* diluído em BTS ou X-Cell® observadas durante 48 horas de conservação.

Outro fator a ser considerado é o efeito diluição, visto que a diluição excessiva principalmente em meio eletrolítico, pode ocasionar consideráveis perdas na viabilidade celular (JOHNSON et al., 2000). A resposta inicial do espermatozóide à diluição é aumento da atividade, seguido da redução da motilidade e danos de membrana, eventos que podem estar associados à perda de componentes celulares ou à diluição das substâncias protetoras presentes no fluido seminal (WATSON, 1995). Ortman e Rodriguez-Martinez (1994) observaram que os procedimentos de diluição reduziram a motilidade de 70 a 85% do sêmen fresco para 30 a 40% logo após a diluição com BTS e prévia incubação a 37°C.

### **5.5.2 Efeito do Período de Armazenamento na Manutenção da Sobrevivência Espermática**

A análise de variância mostrou que o tempo de conservação foi o único fator que, efetivamente, influenciou na sobrevivência espermática. Através da comparação das médias, foi possível observar brusca redução na motilidade espermática, vigor e percentual de células viáveis (Tabela 13), bem como o aumento de defeitos espermáticos ao longo do período de conservação. Esse resultado indica que os espermatozóides de *Tayassu tajacu* apresentam maior sensibilidade ao choque pelo frio, muito semelhante ao que ocorre com espermatozóide suíno, considerados os mais sensíveis, quando comparados com outras espécies domésticas (WATSON, 1995).

A resistência dos espermatozóides ao choque térmico difere entre as espécies, em função da composição química e molecular das membranas plasmáticas e mitocondrial, especialmente os ácidos graxos e fosfolípídeos. A sensibilidade de espermatozóides de suínos pode estar relacionada com a baixa relação entre fosfolípídeos e colesterol presentes na membrana plasmática (0,12) considerada inferior a de bovinos (0,38) e de ovinos (0,36), e essa característica pode conferir à camada interna da membrana plasmática vulnerabilidade ao choque pelo frio. Além disso, o espermatozóide de suínos possui baixa porcentagem de fosfatidilcolina e alta porcentagem de fosfatidiletanolamina e esfingomiélnina (DE LEEUW; COLENBRANDER; VERKLEIJ, 1990). Até o presente momento, não existem relatos sobre a composição química e molecular da membrana plasmática de espermatozóides de caititus, que apesar da semelhança com suínos, pode apresentar alguma característica que a diferencie e permita o esclarecimento da vulnerabilidade dos espermatozóides ao frio, observada no presente estudo.

Tabela 13- Médias ( $\pm$ DP) de motilidade, vigor e viabilidade espermática no sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell®, observadas durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.

Tempo de Armazenamento	Motilidade (%)	Vigor	Viabilidade (%)
<b>T0</b>	55,2 $\pm$ 19,8 <sup>a</sup> (10,0-80,0)	2,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup> (1-3)	59,0 $\pm$ 19,4 <sup>a</sup> (15,0-85,0)
<b>T24</b>	22,5 $\pm$ 25,9 <sup>b</sup> (0-80,0)	1,1 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup> (0-3)	30,4 $\pm$ 25,2 <sup>b</sup> (0-80,0)
<b>T48</b>	10,9 $\pm$ 22,0 <sup>c</sup> (0-70,0)	0,5 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup> (0-2)	15,8 $\pm$ 23,1 <sup>c</sup> (0-71,0)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Durante o período de conservação ocorrem mudanças estruturais e funcionais decorrentes do processo de envelhecimento celular que pode sofrer influência das condições e do tempo de armazenamento. As mudanças funcionais estão relacionadas a alterações em mitocôndrias, flagelo, acrossoma e membrana plasmática (JOHNSON et al., 2000). Quando efetuado de modo inadequado, a refrigeração provoca choque térmico, que induz a danos normalmente irreversíveis aos espermatozóides, tais como lesões no acrossoma, danos na membrana plasmática, com queda da motilidade, movimentação anormal das células, redução da atividade metabólica e perda dos componentes celulares (JOHNSON et al., 2000) O choque pelo frio ocorre quando o sêmen fresco é refrigerado rapidamente da temperatura corpórea a temperaturas abaixo de 15°C, tendo como consequência a redução do número de células com viabilidade. A rápida refrigeração de 35°C para 15°C resulta redução da motilidade espermática (WEBER, 1989) e pode ser evitado com uso de incubação a 22°C em caixa isotérmica (KATZER et al., 2005) ou com uso de colunas de líquido para proteção do material a ser refrigerado (NASCIMENTO et al., 1998).

A redução da motilidade e da viabilidade observadas no estudo, durante 48 horas de conservação (Gráfico10) sob 17°C pode ter sido provocada pelo choque térmico, tendo como consequência alterações físicas e estruturais na membrana plasmática que levaram a brusca redução da motilidade. A motilidade foi reduzida de 55,2% para 10,9%, enquanto que o vigor reduziu de 2,3 a 0,5. A severidade do efeito observado nas 48 horas de conservação pode estar relacionada com a velocidade de refrigeração e ausência de temperatura de incubação prévia, uma vez que a refrigeração muito rápida leva ao choque térmico e este, por sua vez, causa danos severos aos espermatozóides (WATSON e PLUMMER, 1985). Os dados encontrados

corroboram os achados de Kommisrud et al. (2002), que observaram queda na motilidade e redução da integridade acrossômica pós-refrigeração, provocadas pelo tempo de estocagem do sêmen.

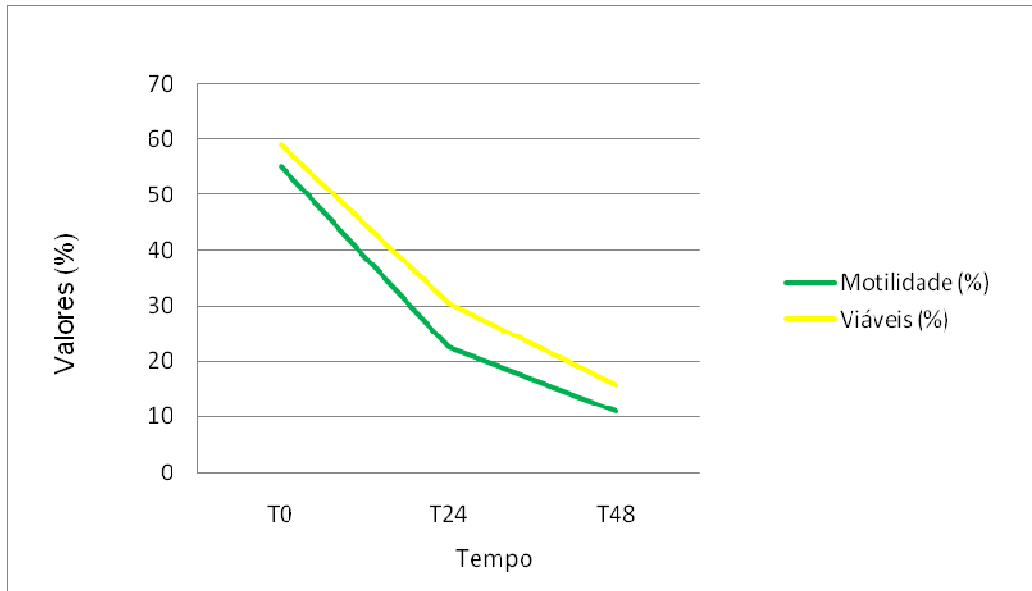


Gráfico 10- Motilidade e viabilidade espermiáticas em sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell®, durante 48 horas de conservação.

A membrana plasmática é composta por camada mista de fosfolipídeos e, ao ser submetida ao frio induzido, a mesma sofre a reorganização estrutural de seus componentes, de forma que as proteínas ficam alojadas em ambiente lipídico não fisiológico, ou seja, ficam agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídeos gelificados, sendo depositadas em locais onde há lipídeos em estado fluidos. Esse rearranjo interfere negativamente na integridade estrutural, na fluidificação da membrana, na disponibilidade de ATP e AMP cíclico e no funcionamento das bombas de íons, provocando o desequilíbrio iônico, que acarreta aumento da permeabilidade celular, principalmente da região da cauda, além dos danos nos elementos do axonema, tendo como consequência a queda da motilidade espermiática (WATSON, 1995).

No choque térmico ocorre acúmulo intracelular de Ca, Na, Zn e perda de íons K, e Mg, desprendimento e perda de conteúdo do acrossoma, perda de enzimas, proteínas e lipídeos, perdas na membrana plasmática na região da peça intermediária e cauda e mudança na estrutura interna das mitocôndrias, caracterizando danos incompatíveis com a fertilidade espermiática. Outro fator que pode interferir na resposta espermiática ao frio induzido é a variação entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo animal, concernente à manutenção da

capacidade fertilizante do sêmen durante a estocagem, a composição química do ejaculado e a produção de plasma seminal, importante para motilidade espermática (WATSON, 2000). No presente estudo, foi possível observar que alguns indivíduos tiveram pequena redução na motilidade espermática durante 48 horas de conservação, enquanto que outros apresentaram brusca redução nas primeiras 24 horas de estocagem. Segundo Thurston et al. (2001), suínos podem ser classificados de acordo com a capacidade de congelamento espermático, como bons, moderados ou maus congeladores, de acordo com a motilidade e morfologia espermática relacionada com a qualidade seminal.

Segundo Pursel; Johnson; Schulman (1973), os espermatozóides de suínos adquirem resistência ao frio ao serem incubados a 15°C e, por isso, elevam as taxas de sobrevivência ao serem submetidos à conservação. No presente estudo, as células apresentaram grande sensibilidade durante todo o período de estocagem, uma vez que nas primeiras 24 horas houve redução de 40% na motilidade e 47% no vigor. Após 48 horas de estocagem, a motilidade caiu 80% e o vigor em 78%, sugerindo que o tempo para aquisição de resistência ao frio supera 48 horas de estocagem ou, ainda, reflete a extrema sensibilidade de espermatozóides de caimitus ao frio induzido, de forma que muitas células tenham sofrido lesões irreversíveis. Esses achados estão em desacordo com os resultados de Katzer et al. (2005), que compararam a manutenção da motilidade e integridade de acrossoma de sêmen de suínos a 17°C e a 5°C, constatando que a 17°C os índices de motilidade e integridade de acrossoma permaneceram superiores a 60% em 48 horas de estocagem, havendo redução somente a partir de 120 horas; já a 5°C, a motilidade e integridade de acrossoma foram pouco superiores a 60%, em 48 horas.

Não foi verificada diferença significativa em relação à manutenção da motilidade espermática relacionada aos diluidores testados, mesmo que numericamente a motilidade obtida com X-Cell® tenha se mantido mais elevada, tanto em T24 quanto em T48. Havia a expectativa de que a motilidade, para ambos os diluidores, fosse mantida em níveis próximos a 40% durante 48 horas, como ocorre para o sêmen suíno. O diluidor BTS poderia ter apresentado melhores resultados, por manter os níveis de potássio e de sódio adequados para o funcionamento da bomba de sódio e potássio, favorecendo a motilidade (ALVAREZ e STOREY, 1982). Por outro lado, a presença de bicarbonato na sua formulação pode ter sido responsável pela modificação da arquitetura lipídica da membrana plasmática, favorecendo o início da capacitação espermática (HARRISON, 1996).

Haugan et al. (2007), ao compararem a fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído com BTS ou X-Cell®, não observaram diferenças significativas ( $P < 0,005$ ). De

Ambrogi et al. (2006) avaliaram a motilidade, integridade de membrana e da cromatina de espermatozóides suínos, e concluíram que não há diferença significativa entre BTS e X-Cell® em relação à capacidade de preservação da viabilidade e integridade de cromatina, e que a reduzida motilidade após estocagem pode afetar significativamente a capacidade fertilizante de espermatozóides.

Os resultados de comparação de médias para viabilidade descreveram um perfil semelhante ao encontrado para motilidade e o vigor. A taxa de declínio da viabilidade após 48 horas de estocagem, girou em torno de 73%, indicando que a preservação através do frio induzido acarretou muitas alterações estruturais que comprometeram a integridade de membrana, confirmando a sensibilidade espermática ao frio. Esses resultados encontrados são divergentes dos achados de De Ambrogi et al. (2006), que observaram aproximadamente 90% de espermatozóides viáveis durante 96 horas de estocagem a 17°C para sêmen suíno, diluído em BTS ou X-Cell®, não havendo diferença significativa entre diluidores; no entanto, os autores observaram a influência da variação individual.

No presente trabalho, não houve diferença significativa entre diluidores, e estes se mostraram igualmente úteis para a conservação seminal. No entanto, ao analisar os valores de motilidade espermática, vigor e viabilidade obtidos para sêmen diluído com X-Cell® durante 48 horas de armazenamento, foi possível detectar ligeira superioridade deste diluente na manutenção da sobrevivência espermática, uma vez que, após 24 horas de estocagem, este foi capaz de manter motilidade média de 27% e viabilidade espermática de 33%, que apesar de serem considerados valores baixos em animais domésticos, podem ser representativos para obtenção de fertilidade em espécies silvestres, como é o caso de caítilus.

As comparações entre médias de defeitos maiores, defeitos menores e totais em função do tempo de estocagem podem ser observadas na Tabela 14. Foram detectadas diferenças significativas durante tempo de estocagem somente para defeitos maiores e totais, independentemente do diluidor usado. Não foi observada diferença entre defeitos menores entre T0, T24 e T48 ( $F=0,56$ ).



Tabela 14- Médias de defeitos maiores, menores e totais (média±DP) encontrados no sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell®, durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.

Tempo de Armazenamento	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
<b>T0</b>	19,8±10,1 <sup>a</sup> (5,5-54,0)	9,8±4,4 <sup>a</sup> (3,0-21,5)	29,4±10,9 <sup>a</sup> (13,5-63,0)
<b>T24</b>	29,5±11,9 <sup>b</sup> (7,5-66,0)	9,7±5,1 <sup>a</sup> (2,0-23,5)	39,3±12,7 <sup>b</sup> (19,5-74,0)
<b>T48</b>	32,2±12,5 <sup>c</sup> (9,5-69,0)	10,4±5,3 <sup>a</sup> (2,5-27,0)	42,7±12,9 <sup>c</sup> (22,0-77,0)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Durante o período de estocagem foi observado um aumento de 38,6% de defeitos maiores e de 31,2% de defeitos totais. No Gráfico 11 pode-se observar o aumento de defeitos maiores e de defeitos totais, indicando importantes alterações estruturais ocorridas nos espermatozóides. Os procedimentos relacionados à diluição e à refrigeração também são responsáveis pela ocorrência de patologias, principalmente relacionadas às estruturas da cauda e acrossoma, induzindo a mudanças na capacitação espermática e reação acrossômica (WATSON, 2000).

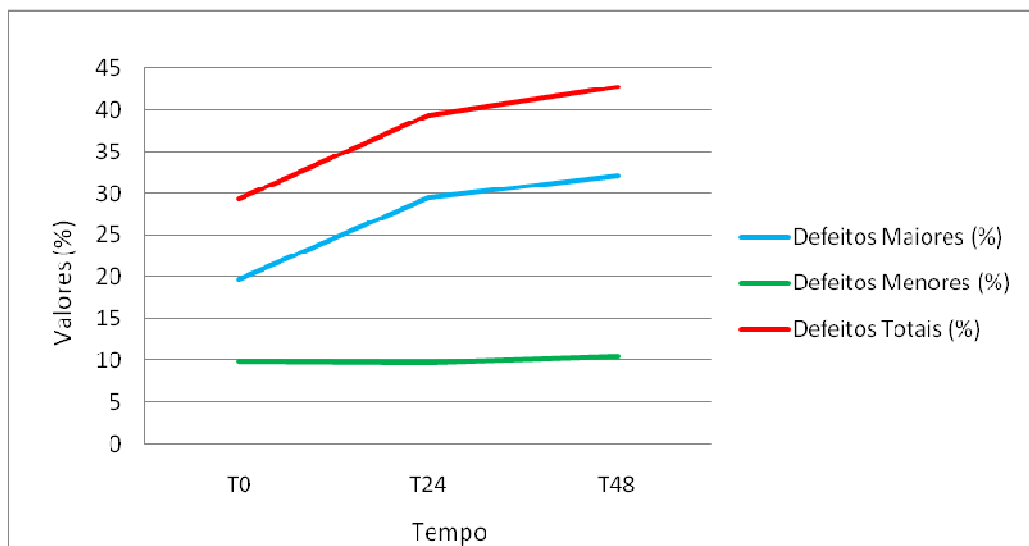


Gráfico 11- Ocorrência de defeitos maiores, menores e totais no sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell®, no decorrer de 48 horas de conservação.

Células espermáticas sob refrigeração a 17°C não possuem o metabolismo celular totalmente reduzido, fazendo com que haja maior susceptibilidade às alterações morfofuncionais (WATSON, 1995). No presente estudo, após 48 horas de armazenamento os defeitos maiores de maior ocorrência foram cauda fortemente dobrada, acrossoma e gota protoplasmática proximal, sendo estes resultados sumariados na Tabela 15.

Tabela 15- Defeitos maiores (média±DP) observados no sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell® observados durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.

Tempo de Armazenamento	CFDE (%)	Acrossoma (%)	GPP (%)
T0	8,2±8,4 <sup>a</sup>	6,3±5,7 <sup>a</sup>	3,3±4,2 <sup>a</sup>
T24	13,5±9,9 <sup>b</sup>	8,7±6,2 <sup>b</sup>	4,6±4,8 <sup>b</sup>
T48	15,1±10,0 <sup>b</sup>	10,2±6,1 <sup>c</sup>	4,5±4,4 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

CFDE- Cauda fortemente dobrada ou enrolada

GPP- Gota protoplasmática proximal

O defeito maior mais freqüentemente observado foi cauda fortemente dobrada, independente do diluidor utilizado. Esses resultados reforçam a ocorrência de choque térmico em função do aumento da patologia em 39 %, principalmente após 24 horas de estocagem, já que não houve diferença significativa entre T24 e T48. A ocorrência dessa patologia estabelece o padrão anormal do movimento celular, com perda da motilidade progressiva, inviabilizando o ejaculado, uma vez que, os espermatozóides perdem a capacidade de percorrer a o trato reprodutor feminino e alcançar a zona pelúcida para que se proceda à fecundação. Alterações no acrossoma foram significativas durante todo o período de armazenamento, havendo aumento de aproximadamente 38,3% de alterações entre o momento da diluição e 48 horas de estocagem. Esse aumento pode estar relacionado com as injúrias ocasionadas pelo frio ou pelo rápido aquecimento, levando ao destacamento na membrana acrossômica entre outras alterações (BAMBA e CRAN, 1985). A incidência de gota protoplasmática proximal pode estar associada à espermatogênese anormal em machos adultos, não havendo efeito do processo de refrigeração sobre essa patologia (BARTH e OKO, 1989).

Os defeitos menores encontrados nos ejaculados diluídos e estocados podem ser observados na Tabela 16. Não foi observada diferença significativa para cauda dobrada e inserção abaxial, tanto para o fator armazenamento quanto para os diluidores testados. A incidência de gota protoplasmática sofreu redução significativa entre T0 e T48. Waberski et

al. (1994) indicam haver correlação negativa entre a proporção de gota distal e fertilidade, para suínos.

Tabela 16- Defeitos menores (média±DP) observados no sêmen de *Tayassu tajacu* diluído com BTS ou X-Cell® observadas durante o período de conservação. Belém-PA, 2009.

<b>Tempo de Armazenamento</b>	<b>GPD (%)</b>	<b>IAB (%)</b>	<b>CD (%)</b>
<b>T0</b>	5,7±5,4 <sup>a</sup>	2,5±2,6 <sup>a</sup>	1,2±2,4 <sup>a</sup>
<b>T24</b>	4,6±5,0 <sup>ab</sup>	2,6±2,9 <sup>a</sup>	2,0±4,3 <sup>a</sup>
<b>T48</b>	4,1±4,7 <sup>b</sup>	2,5±3,2 <sup>a</sup>	2,3±4,2 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

GPD- Gota citoplasmática distal

IAB- inserção abaxial

CD- Cauda dobrada

A inserção abaxial foi identificada, porém com baixa frequência nos espermatozoides de caïtutus. A cabeça do espermatozoide de caïtutus possui base mais larga que as células das outras espécies e pode favorecer a implantação descentralizada da peça intermediária. A cauda dobrada também ocorreu em baixos níveis e não houve diferença significativa nos tempos investigados durante o armazenamento.

O sêmen de caïtutus provavelmente apresenta algumas semelhanças com sêmen de suínos (HELLGREN et al., 1989). No presente estudo, foi observada semelhança com relação à baixa resistência dos espermatozoides à manipulação extracorpórea e à sensibilidade ao frio, provavelmente pela vulnerabilidade da membrana plasmática à refrigeração e ao reaquecimento (BAMBA e CRAN, 1985). Isso gera demanda por mais estudos concernentes à composição química, molecular e ultra-estrutural do espermatozoide de caïtutus, sobre o uso de diferentes diluidores seminais e métodos de criopreservação de mais longa duração, a fim de possibilitar o uso da inseminação artificial como tecnologia para conservação e melhoramento genético de caïtutus.

## 6. CONCLUSÕES

A eletroejaculação, após uso de protocolo para sedação/analgesia dos animais, pode ser considerada como método eficiente e seguro para a obtenção de sêmen de caititus.

Machos adultos apresentam testículos esquerdo e direito simétricos e de consistência intermediária.

O sêmen dos animais da espécie *Tayassu tajacu* criados em cativeiro apresenta as seguintes características médias: volume  $0,81 \pm 0,86$  mL, concentração  $137,44 \pm 153 \times 10^6$  spz/mL, pH  $7,92 \pm 0,73$ , motilidade  $52,66 \pm 28,79\%$ , vigor  $2,2 \pm 0,8$ , viabilidade  $55,84 \pm 28,55\%$ , defeitos maiores  $22,87 \pm 12,93\%$ , defeitos menores  $9,11 \pm 5,88\%$  e defeitos totais  $31,52 \pm 13,81\%$ .

As características seminais dos animais experimentais apresentam variações durante os meses do ano, mas os caititus machos podem ser considerados animais de reprodução não-sazonal.

O sêmen de caititus pode ser resfriado e armazenado a  $17^\circ\text{C}$  por período de até 24 horas, apesar dos espermatozoides se mostrarem altamente sensíveis ao estresse pelo frio.

Os diluidores BTS (curta duração) e X-Cell® (longa duração) apresentaram a mesma eficiência para o armazenamento do sêmen resfriado durante 24 e 48 horas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J.G; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v.27, p.1102-1108, 1982.
- AUSTIN, J.W; HUPP, E.W; MURPHREE, R.L. Comparison of Quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. **Journal of Dairy Science**, v.44, n. 12, 1961.
- BALL, B.A. An introduction to the use and implication of cryopreserved equine semen. In: EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, Davis, CA, 1998. **Proceedings**. Davis: School of Veterinary Medicine, University of California, 1998, p.25-43.
- BAMBA, K; CRAN, D.G. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.75, p.133-138, 1985.
- BANCO DO BRASIL. Indicadores Econômicos Financeiros do Mercado, 2009. Disponível em <<http://cotacoes.agronegocios-e.com.br/investimentos>>. Acesso em: 26 jun 2009.
- BARROS, F.F.P; LIMA, G.L; COSTA, L.L.M; FREITAS, C.I.A; SILVA, A.R. Características do sêmen de quatis (*Nasua nasua*) mantidos em cativeiro, coletados por meio de eletroejaculação. In: VIII CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 2008a, Rio Branco-Acre Brasil. **Anais...** Rio Branco: SEMEA, 2008. p.137.
- BARROS, F.F.P; SERAFIM, M.K.B; COSTA, L.L.M; FREITAS, C.I.A; SILVA, A.R. Eficiência da coleta de sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) por meio de eletroejaculação. In: VIII CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 2008b, Rio Branco-Acre Brasil. **Anais...** Rio Branco: SEMEA, 2008. p.138.
- BARTH, A.D; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1989, 285p.
- BLOM, E. **On the evaluation of bull semen with special reference to the employment for artificial insemination**. Copenhaguen: Carl F. Mortensen, 1950, p.200-223.
- BRITT, J.H; ALMOND, G.W; FLOWERS, W.L. Diseases of the reproductive system. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D. (eds), **Diseases of Swine**, 8th ed. Blackwell Science Ltd, Ames, IA, 1999, 905p.

BUSSO, J; PONZIO, M; CHIARAVIGLIO, M; FIOLE DE CUNEL, M; RUIZ, R. Electroejaculation in the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. **Research in Veterinary Science**, v.78, n.1, p.93-97, 2004.

CARVALHAL, R; CAGNOTO, D.G; DANIEL, R.J. Aspectos morfológicos dos testículos e funículos espermáticos de catetos. **Brazilian Journal of Morphology Science**, n.17, Suppl. p.178, 2000.

CASTRO, M.L.S; DESCHAMPS, J.C; MEINKE, W; SIEWEDT, F; CARDELINO, R.A. Influência do período de coleta sobre o volume, motilidade e doses de sêmen em suínos. **Ciência Rural**, v.26, n.3, p.457-462, 1996.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação seminal**. 2º ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

COSTA, D.S; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação de sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotropica**, v.5, n.2, p.1-6, 2005. Disponível em:<<http://www.biotaneotropica.org.br>>. Acesso em: 1 nov. 2006.

COSTA, D.S; HENRY, M; PAULA, T.A.R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.46-51, 2004.

COSTA, D.S; SILVA, J.F; SILVEIRA, L.S. Morphometry of Leydig cells in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.5, p.384-389, 2007.

COUROT, T.M; COLAS, G. **The role of the male in embryonic mortality**. In: Greenan JM, Diskin MG, editors. Embryonic mortality in farm animals. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986, p.196-206.

DE AMBROGI, M; BALLESTER, J; SARAVIA, F; CABALLERO, I; JOHANNISSON, A; WALLGREN, M; ANDERSSON, M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of storage in short and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.29, n.5, p.543-552, 2006.

DE LEEUW, F.E; COLENBRANDER, B; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction of Domestic Animals**, Suppl. 1, p. 95-104, 1990.

DEUSTSCH, L.A; PUGLIA, L.R.R. **Os animais silvestres: produção e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988, 69-72p.

DURANTHON, V; RENARD, J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a Convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, v.55, p.1277-89, 2001.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia e Informática na Agricultura Software de Análise Estatística NTIA. Campinas, 1997.

EVANS, L.E; KO, J.C. Electroejaculation and artificial insemination in Vietnamese potbellied miniature pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, n.10, p.1366, 1990.

ESTIENNE, M.J; HARPER, A.F; DAY, J.L. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. **Reproductive Biology**, v.7, n.3, p. 221-231, 2007. Disponível em: <<http://www.pan.olsztyn.pl>>. Acesso em: 11 fev. 2008.

FILGUEIRA, K.D; MOURA, C.E.B; BATISTA, J.S; SILVA, S.M.M.S; OLIVEIRA, M.F; ALBUQUERQUE, J.F.G; MIGLINO, M.A. Biometria e alterações histopatológicas em testículos de catetos (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro no semi-árido nordestino, Brasil / Biometric and histopathological alterations in testicules of collared peccary (*Tayassu tajacu*) created in captivity in the semi-arid Northeasterner, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.1, p.19-25, 2005.

FISCHMAN, M.L; SUHEVIC, J; RIVOLTA, M.A; CISALE, H.O. Collection of wild boar semen by electroejaculation. **The Veterinary Record**, v.153, p.365-366, 2003.

FLOWERS, W.L. Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **Journal of Animal Science**, v.80, Suppl 1, p.47-53, 2002.

GALLOWAY, D.B. Introductory review, factors affecting fertility. **In: Bulls Course held.** The University of Queensland Veterinary School, 1974, p.2-23.

GIULIANO, S; DIRECTOR, A; GAMBAROTTA, M; TRASORRAS, V; MIRAGAYA, M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Llama glama*). **Animal Reproduction Science**, v.104, p.354-358, 2007.

GADEAL, J; MATAS, C. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.54, p.1343-1357, 2000.

GARCIA, S.K; BARBOSA, A.S. Características etiológicas, biométricas e seminais de varrões da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.279-289, 1994.

GOULD, K.G; WARNER, H; MARTIN, D. E. Rectal probe electroejaculation. **Journal of Medical Primatology**, v.7, p.213-222, 1978.

GUIMARÃES, D. A. A; SILVA, J.V; MAYOR, P; LE PENDU, Y; ALBUQUERQUE, N.I; NOGUEIRA FILHO, S.L.G. Reproductive biology of female collared peccaries (*Tayassu tajacu*) raised in captivity in Amazon region. In: **La Faune Sauvage: Une Ressource Naturelle. VI SYMPOSIUM SUR L'UTILISATION DE LA FAUNE SAUVAGE- VI INTERNACIONAL WILDLIFE RANCHING SYMPOSIUM**, Paris, França, 2004, p.136-137.

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

HARON, W; MING, Y; ZAINUDDIN, Z.Z. Evaluation of semen collected by electroejaculation from captive Lesser Malay Chevrotain (*Tragulus javanicus*). **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v.31, p.164-167, 2000.

HAUGAN, T; GAUSTAD, A.H; REKSEN, O; GROHN, Y.T; HOFMO, P.O. Fertility results of artificial inseminations performed with liquid boar semen stored in X-Cell vs BTS extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.94-99, 2007.

HARRISON, R.A.P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.581-594, 1996.

HELLGREN, E.C; LOCHMILLER, R.L; AMOSS, M.S.J.R; SEAGER, S.W; MAGYAR, S. J; COSCARELLI, K.P; GRANT, W. E. Seasonal variation in serum testosterone testicular measurements and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.85, p.677-686, 1989.

HOMMA, A.K.O. **O extrativismo animal na Amazônia: o caso de uma economia ilegal**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1992. 86p.

JOHNSTON, L.A; ARMSTRONG, D.L; BROWN, J.L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.229-236, 1994.

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

KAHWAGE, P.R; GARCIA, A.R; BARTHA, M.M.P; GUIMARÃES, D.A.A; LUZ-RAMOS, R; OHASHI, O.M. Eletroejaculação e características seminais de caititus (*Tayassu tajacu*). In: III REUNIÃO REGIONAL DA FESBE, 2008, Fortaleza-CE. **Anais...** Fortaleza: FeSBE, 2008a.

KAHWAGE, P.R; GARCIA, A.R; BARTHA, M.M.P; GUIMARÃES, D.A.A; LUZ-RAMOS, R; DIAS, H.L.T; ALBUQUERQUE, N.I; OHASHI, O.M. Desenvolvimento de protocolo de sedação e analgesia em caititus (*Tayassu tajacu*) para coleta de sêmen por eletroejaculação. In: 35º CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA,



2008, Gramado-RS. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008b.

KARABINUS, D.S; EVENSON, D.P; KAPROTH, M.T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.11, p.3836-3848, 1991.

KATZER, L.H; BERNARDI, M.L; BORTOLOZZO, F.P; WENTZ, I. Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5°C de acordo com taxa de resfriamento e incubação prévia. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.138-144, 2005.

KOMMISRUUD, E; PAULENZ, H; SEHESTED, E; GREVLE, I.S. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.43, p.49-55, 2002.

KUNAVONKRIFT, A; SURIYASOMBOON, A; LUNDEHEIM, N; HEARD, T.W; EINARSSON, S. Management and sperm productions of boar under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v.63, p.43-47, 2005.

LIVA, H; MORAES, L.F.D; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G; LAVORENTI, A. Aspectos da alimentação do caititu (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. **Anais...** Congresso Paulista de Iniciação Científica, I, Piracicaba, 1989.

LOBO, F.S. **Mamíferos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Artes Gráficas Gomes de Sousa, 1962.

LOCHMILLER, R.L; HELLGREN, E.C ; VARNER, L.W; GREENE, L.W; AMOSS, M.S; SEAGER, S.W.J; GRANT, W.E. Physiological responses of the adult male collared peccary *Tayasu tajacu* (*Tayassuidae*), to severe dietary restriction. **Comparative Biochemistry Physiologic**, v.82, n.1, p.49-58, 1985.

LOUVANDINI, H; McMANUS, C; MARTINS, R.D; LUCCI, C.M; CORREA, P.S. Características biométricas e testiculares em carneiros santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação protéica e tratamentos anti-helmínticos. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.638-647, 2008.

MACHÁTY, Z; TAKÁCS, T; GÁTHY, I. Fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville TS (BTS) and Modified Kiev (MK) extenders in relation to storage time and number of spermatozoa per insemination dose. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.289-295, 2003.

MATEI, J.F. **Influence of the male in embryonic mortality**. In: Courot M, editor. The male in farm animal reproduction. Boston: Martinus Nijhoff, 1984. p.350-69.

MARTIN, I.C.A. The principles and practice of electroejaculation of mammals. **Symposium of Zoological Society of London**, n.43, p.127-52, 1978.

MARTIN, G.B; TJONDRONEGORO, S; BLACKBERRY, M. A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.121-128, 1994.

MARTINEZ, F; ALVAREZ, M; MORATO-MORALES, A; GARCIA-ALVAREZ, O; SOLER, A.J; GARDE, J.J; PAZ, P; ANEL, L. Sperm parameters of Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collections. **Theriogenology**, v.70, n.2, p.216-226, 2008.

MAYOR, P; LÓPEZ-GATIUS, F; LÓPEZ-BÉJAR, M. Integrating ultrasonography within the reproductive management of the collared peccary (*Tayassu tajacu*), **Theriogenology**, v.63, p.1832-1843, 2005.

MAYOR, P; GUIMARAES, D.A; LOPEZ-GATIUS, F; LOPEZ-BEJAR, M. First postpartum estrus and pregnancy in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the amazon. **Theriogenology**, v.66, n.8, p.2001-2007, 2006.

MAYOR, P; GÁLVEZ, H; GUIMARÃES, D.A; LÓPEZ-GATIUS, F; LÓPEZ-BÉJAR, M. Serum estradiol-17 $\beta$ , vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region, **Animal Reproduction Science**, v.97, p.165-174, 2007a.

MAYOR, P; GUIMARÃES, D.A.A; LE PENDU, I; DA SILVA, J; JORI, F; LÓPEZ-BÉJAR, M. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.88-97, 2007b.

MIES FILHO, A. **Reprodução de animais**. 6 ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v.1/2, 750p.

MINTER, L.J; DE LIBERTO, T.J. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). **Theriogenology**, v.69, n.8, p.946-952, 2008.

MOLLINEAU, W.M; ADOGWA, A.O; GARCIA, G.W. A preliminary technique for electroejaculation for agouti (*Dasyprocta leporina*). **Animal Reproduction Science**, 2007. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/anireprosci>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

MORATO, R.G; GUIMARÃES, M.A.V.B; 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*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.4, p.178-181, 1998.

MOREIRA, N; ERDMANN, R.H; DELGADO, L.E.S; PACHALY, J.R; CIFFOMI, E.M; HATAMOTO, L.K. Coleta de sêmen e avaliação andrológica de queixada (*Tayassu pecari*). **Anais... IX CONGRESSO E XIV ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE**

VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SILVESTRES (ABRAVAS). Centro Universitário Rio Preto (UNIRP). São José do Rio Preto-SP, 26 a 30 de Julho, 2005, p.67.

NASCIMENTO, V.R; VALE FILHO, V.R; SILVA FILHO, J.M; NASCIMENTO, J.K.F. Efeito da taxa de refrigeração sobre a motilidade, sobrevivência e morfologia espermática de varrões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.6, p.691-694, 1998.

NOWAK, R.M. Order Artiodactyla. In: NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World** 5. ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 1991. p.1334-1347.

OKANO, T; MURASE, T; TSUBOTA, T. Electroejaculation and semen cryopreservation of free ranger Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, n.11, p.1371-1376, 2004.

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

PACHECO, N.A; BASTOS, T.X. **Boletim Agrometereológico**. Belém: Embrapa- Amazônia Oriental, 2007, 34.p (Boletim de pesquisa).

PURSEL, V; JOHNSON, L.A; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.37, p.528-531, p.1973.

REDFORD, K.F. The Empty Forest. **Bioscience**, v.42, p.412-422, 1992.

RODGER, J.C, POLLITT, C.C. Radiographic examination of electroejaculation in marsupials. **Biology of Reproduction**, v.24, p.1125-1134, 1981.

ROTHSCHILD, L; CLELAND, K.W. The Physiology of Sea-Urchin Spermatozoa : The Nature and Location of the Endogenous Substrate. **Journal of Experimental Biology**, v.29, p.66-71, 1952.

SONNER, J.B; MIGLINO, M.A; SANTOS, T.C; CARVALHAL, R; NETO, A.C.A, MOURA, C.E.B; OLIVEIRA, M.F. Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. **Biota Neotropica**, v.4, n.2, p.1-12, 2004. Disponível em <<http://www.biotaneotropica.org.br/v4n2/pt/abstract?article>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

SOUZA, A.L.P; CASTELO, T.S; QUEIROZ, J.P.A.F; BARROS, I.O; PAULA, V.V; OLIVEIRA, M.F; SILVA, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. **Animal Reproduction Science**, No prelo. 2009.

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

SURIYASOMBOON, A; LUNDEHEIM, N; KUNA VONGKRIT, A; EINARSSON, S. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.67, n.8, p.777-785, 2005.

THURSTON, L.M; WATSON, P.F; MILEHAM, A.J; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.22, p.382-394, 2001.

VALLE, R.R; GUIMARÃES, M.A.V.B; MUNIZ, J.A.P.C; BARNABE, R.C; VALE, W.G. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). **Theriogenology**, v.62, p.131-138, 2004.

VASCONCELOS, A.N.M.A; MORAES, G; MOREIRA, I; RIGOLON, L.P; MARTINS, E. N. Características espermáticas de sêmen resfriado de suíno e conservação em diferentes diluentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.394-401, 2001.

VERA CRUZ, N.C. Artificial insemination in pigs. I Semen collection by electrical stimulation in boars. **Phillip Agriculture**, v.43, p.225-235, 1959.

VIU, M.A.O; MAGNABOSCO, C.U; FERRAZ, H.T; GAMBARINI, M.L; OLIVEIRA FILHO, B.D; LOPES, D.T; VIU, A.M.F. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na Região Centro-Oeste do Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.53-57, 2006.

VYT, P; MAES, D; DEJONCKHEERE, E; CASTRYCK, F; VAN SOOM, A. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen, **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, p.8-12, 2004.

WABERSKI, D; WEITZE, K.F; GLEUMES, T; SCHWARZ, M; WILLMEN, T; PETZOLDT, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen, **Theriogenology**, v.42, p.831-840, 1994.

WATSON, P.F; PLUMMER, J.M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: CONFERENCE DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1985, Uppsala. **Proceedings ...Uppsala**. Swedish University.of Agriculture Sciences, 1985, p.113-127.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.1, p.135-140, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.481-492, 2000.

WEBER, H. **Influence of dilution media, incubation and cooling rate on cold-shock sensitivity of boar spermatozoa.**1989.103p Thesis-School of Veterinary Medicine, Hannover,1989.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.639-658, 1993.