



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FÁBIO JOSÉ RIBEIRO SIMAS

PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE CACHAÇOS
SUPLEMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE L- GLUTAMINA E L- ÁCIDO
GLUTÂMICO

RECIFE

2025

FÁBIO JOSÉ RIBEIRO SIMAS

**PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE CACHAÇOS
SUPLEMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE L-GLUTAMINA E
L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, para obtenção do título de
Doutor em Zootecnia

Área de concentração: Zootecnia

Orientador (a) Profa. Dra. Helena Emília
Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso

Coorientadoras:
Profa. Dra. Jorgea Pradieé.
Profa. Dra. Mariana Groke Marques.

RECIFE

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Lorena Teles – CRB-4 1774

S588p

Simas, Fábio José Ribeiro.

Produtividade e qualidade espermática de cachacos suplementados com níveis crescentes de L- glutamina e L- ácido glutâmico na dieta / Fábio José Ribeiro Simas. – Recife, 2025.

98 f.; il.

Orientador(a): Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso.

Co-orientador(a): Jorgea Pradieé.

Co-orientador(a): Mariana Groke Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Recife, BR-PE, 2025.

Inclui referências.

1. Aminoácidos na nutrição animal. 2. Suínos - Reprodução. 3. Colheita de sêmen animal . 4. Suplementos dietéticos I. Manso, Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro, orient. II. Pradieé, Jorgea, coorient. III. Marques, Mariana Groke, coorient. IV. Título

CDD 636



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE CACHAÇOS
SUPLEMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE L-GLUTAMINA E
L-ÁCIDO GLUTÂMICO**

Tese elaborada por

FÁBIO JOSÉ RIBEIRO SIMAS

Aprovado em 26 / 02 / 2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br HELENA EMILIA CAVALCANTI DA COSTA CORDEI
Data: 17/04/2025 11:31:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dra. Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
(Orientador (a))

Documento assinado digitalmente
gov.br CAMILLA MENDONCA SILVA
Data: 16/04/2025 19:38:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dra. Camilla Mendonça Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Documento assinado digitalmente
gov.br JORGEA PRADIEE
Data: 16/04/2025 09:51:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Jorgesa Pradié
Faculdade de Veterinária Atitus

Documento assinado digitalmente
gov.br LILIAN FRANCISCO ARANTES DE SOUZA
Data: 17/04/2025 10:45:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIANA GROKE MARQUES
Data: 16/04/2025 10:23:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Mariana Groke Marques
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

À minha esposa e filho, por me acompanharem durante essa jornada e por acreditarem que o estudo é o caminho que poderá proporcionar dias melhores em nossas vidas, assim como, meus familiares, que também estiveram sempre ao meu lado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu amado Pai Deus, por me acompanhar e proteger ao longo dessa jornada, me proporcionando saúde, sabedoria, discernimento na tomada das inúmeras decisões nesse trajeto e me manter focado para conseguir conduzir à realização e conclusão desse trabalho.

À minha amada esposa, Albiane Silva dos Santos, pelo apoio incondicional, companheirismo e dedicação nos momentos difíceis que enfrentamos para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Ao meu filho, Fábio José Ribeiro Simas Júnior, que, com muita paciência e sabedoria, se manteve focado em seus estudos, não deixando que a distância de mim e de sua mãe interferisse em seus objetivos e, em 2024, colheu o fruto de sua dedicação, com aprovação no curso de Direito.

À minha querida mãe, Maria França Ribeiro Simas, que sempre apoiou, incentivou e lutou para que não só eu, mas todos os seus filhos e netos pudessem seguir no caminho do estudo, e hoje, sou eternamente grato por ter chegado aqui.

Às minhas irmãs, Iana Ribeiro Simas, Iris Simas Ribeiro e Marta Jussara Ribeiro Simas, pela nossa união e persistência em buscar um futuro melhor por meio da educação.

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-PPGZ.

À minha orientadora, Professora Dra. Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso, por toda a atenção, orientações prestadas e, acima de tudo, pela compreensão com minha pessoa durante o período de realização de nosso trabalho.

Às minhas coorientadoras, Professora Dra. Jorgea Pradiei e Dra. Mariana Groke Marques, que contribuíram imensamente para a condução e realização dessa pesquisa. Em nome delas, agradeço também a todo o corpo docente do programa de pós-graduação em Zootecnia-PPGZ.

À Empresa Ajinomoto do Brasil Ltda., pelo apoio e incentivo para realização de pesquisas na área de nutrição animal no Brasil.

À Empresa Bretanha Importação e Exportação Ltda., na pessoa de Dr. Pedro Ivo de Quadros Filho e Dra. Kerlin Calderan, por cederem os animais e toda a estrutura da Central de Disseminação de Genética para a realização de nossa pesquisa.

Aos colaboradores da Central de Disseminação de Genética, Amanda Lara Fonseca, Larissa Lais Santos do Carmo, Camila Musskopf, Gessica Fernanda Moreira, Giovani Rondon

Munzlinger, Elionei Cristina Brutscher, Maria Clara Piazza, Cleomar Fromming, Geovan André Ruhoff e ao cachorro mascote Max, que nos proporcionou momentos de descontração e lazer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

A TUDO E A TODOS, AGRADEÇO!

A educação revitaliza a esperança, que é um sentimento bom e só se fortalece quando somos levados a acreditar que podemos alcançar algo que, muitas vezes, foi conquistado por pessoas que acreditaram e não desistiram, até o sonho se tornar realidade.

Fábio Simas.

PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO

RESUMO: Os aminoácidos L-glutamina (Gln) e L-ácido glutâmico (Glu) têm potencial para compor dietas de cachacos, pois atuam de forma benéfica no organismo animal, podendo exercer efeitos sobre o desempenho produtivo e reprodutivo. O objetivo deste estudo foi avaliar a produtividade e a qualidade espermática do sêmen puro, a durabilidade e a qualidade espermática do sêmen resfriado, bem como a qualidade espermática do sêmen pós-descongelado de 24 cachacos de quatro linhagens comerciais (A, B, C e D), com idade média de $(21,5 \pm 4,40)$ meses), suplementados com 0,0%, 0,5% e 1,0% de Gln e Glu. Durante 120 dias, os animais foram alojados e distribuídos em um delineamento em blocos casualizados (DBC), com três tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0% de Gln e Glu), quatro repetições (blocos), com dois cachacos cada. Diariamente, foram fornecidos 2,5 kg de ração padrão da central (RPC) aos animais, e o suplemento foi fornecido *un top*. Para a morfometria testicular, foram tomadas as medidas de comprimento e largura dos testículos direito e esquerdo no 15º dia (M1) e no 115º dia (M2). Para a avaliação de produtividade e qualidade espermática por ciclo espermático (40, 80 e 120 dias), a fração rica dos ejaculados foi coletada duas vezes por semana e avaliada por meio do sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), quanto à concentração (C), motilidade (M), patologia (P) e número de doses ($ND \ 2 \times 10^9$). Na avaliação da morfologia espermática, utilizando o teste do esfregaço corado, foram avaliados os parâmetros: espermatozoides normais (ESPZN), total de patologias (TP), defeito de cabeça (DC), defeito de acrossoma (DA), peça intermediária (PI), cauda dobrada enrolada (CDE), cauda dobrada com gota citoplasmática proximal e distal (CDGCP e CDGCD), gota citoplasmática proximal e distal (GCP e GCD), cabeça isolada (CI) e no teste supravital, os espermatozoides vivos (V) e mortos (M). Na avaliação do sêmen resfriado, nos dias 40, 80 e 120, após a coleta, a fração rica em espermatozoides dos ejaculados foi diluída (1:1; v/v) no diluidor de resfriamento, envasada em sachê de 80 mL e avaliada quanto à durabilidade nos dias 1 (D1 = 24h) e dia 5 (D5 = 120h), e qualidade: lesão de acrossoma (LA), lesão de membrana plasmática (LMP) e estresse oxidativo do sêmen (EOS), avaliado por citometria de fluxo. Para o congelamento do sêmen, nos dias 92, 99 e 106, após a coleta, a fração rica em espermatozoides foi diluída (1:1; v/v) no diluidor de resfriamento, com o intuito de se obter a concentração adequada para o congelamento. No pós-descongelamento, foram avaliados os parâmetros cinéticos dos espermatozoides em sistema CASA e por citometria de fluxo a lesão de acrossoma (LA), lesão de membrana plasmática (LMP) e estresse oxidativo do sêmen (EOS) e integridade da cromatina (IC). Na morfometria testicular, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre a linhagem (D) e as linhagens (A, B e C), bem como entre as medições (M1) e (M2). Na produtividade e qualidade espermática, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos, com os níveis de (0,5 e 1,0%) superiores ao controle (0,0%), entre as linhagens, com destaque para a linhagem (B), e entre as coletas. Na morfologia espermática, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens, com variações nos resultados entre elas. No sêmen resfriado, houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparadas as 3 coletas, independentemente dos tratamentos, para o (EOS). Na avaliação da durabilidade do sêmen, houve diferença estatística ($p < 0,05$), com aumento de LA e LMP entre os tempos (D1= 24h e D5= 120h), independentemente dos tratamentos. Para o sêmen pós-descongelamento, não houve efeito do tratamento ($p > 0,05$) nos parâmetros cinéticos avaliados, assim como nos parâmetros de (LA, LMP, EOS e IC). Em suma, a suplementação de 0,5% e 1,0% de L-Gln e L-Glu para cachacos proporcionou efeito positivo nos parâmetros de produtividade do sêmen puro, mas não no sêmen resfriado ou sêmen pós-descongelado, indicando, assim, efeitos metabólicos benéficos para esta categoria animal. Tais resultados mostram a necessidade de continuidade das pesquisas para obtenção de melhores resultados na reprodução de suínos por meio da utilização do sêmen resfriado e pós-descongelado.

Palavras-chave: aminoácido, reprodutor suíno, sêmen, suplemento.

PRODUCTIVITY AND SPERM QUALITY OF BOARS SUPPLEMENTED WITH INCREASING LEVELS OF L-GLUTAMINE AND L-GLUTAMIC ACID

ABSTRACT: The amino acids L-glutamine (Gln) and L-glutamic acid (Glu) have the potential to be included in the diets of breeding males, as they act beneficially in the animal's body, potentially exerting effects on productive and reproductive performance. The objective of this study was to evaluate the productivity and quality of pure semen, the durability and quality of cooled semen, as well as the quality of post-thawed semen from 24 males of four commercial lines (A, B, C, and D), with an average age of (21.5 ± 4.40) months, supplemented with (0.0%, 0.5%, and 1.0%) of Gln and Glu. For 120 days, the animals were housed and distributed in a randomized block design (RBD), with three treatments (0.0%, 0.5%, and 1.0% of Gln and Glu), four repetitions (blocks), with two pens each. Daily, 2.5 kg of central standard feed (CSF) were provided to the animals, and the supplement was provided un top. For testicular morphometry, the length and width measurements of the right and left testicles were taken on the 15th day (M1) and the 115th day (M2). For the evaluation of sperm productivity and quality per sperm cycle (40, 80, and 120 days), the rich fraction of the ejaculates was collected twice a week and assessed using the CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) system, regarding concentration (C), motility (M), pathology (P), and number of doses ($ND \times 10^9$). In the evaluation of sperm morphology, using the stained smear test, the following parameters were assessed: normal spermatozoa (NS), total pathologies (TP), head defect (HD), acrosome defect (AD), intermediate piece (IP), coiled tail (CT), tail with proximal and distal cytoplasmic droplet (TPCD and TDC), proximal and distal cytoplasmic droplet (PCD and DCD), isolated head (IH), and in the supravital test, live spermatozoa (LS) and dead spermatozoa (DS). In the evaluation of cooled semen, on days 40, 80, and 120, after collection, the sperm-rich fraction of the ejaculates was diluted (1:1; v/v) in the cooling diluent, packaged in 80 mL pouches, and assessed for durability on day 1 ($D1 = 24h$) and day 5 ($D5 = 120h$), and quality: acrosome damage (AD), plasma membrane damage (PMD), and semen oxidative stress (SOS), evaluated by flow cytometry. For the freezing of semen, on days 92, 99, and 106, after collection, the sperm-rich fraction was diluted (1:1; v/v) in the cooling diluent, with the aim of achieving the appropriate concentration for freezing. In the post-thawing phase, the kinetic parameters of the sperm were evaluated using the CASA system, and through flow cytometry, the acrosome damage (AD), plasma membrane damage (PMD), oxidative stress of the semen (OSS), and chromatin integrity (CI) were assessed. In testicular morphometry, a statistical difference ($p < 0.05$) was observed between lineage (D) and lineages (A, B, and C), as well as between measurements (M1) and (M2). In sperm productivity and quality, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between the treatments, with levels of (0.5 and 1.0%) being higher than the control (0.0%), between the strains, with a highlight for strain (B), and between the collections. In sperm morphology, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between the strains, with variations in the results among them. In cooled semen, there was a statistical difference ($p < 0.05$) when comparing the 3 collections, regardless of the treatments, for (EOS). In the evaluation of semen durability, there was a statistical difference ($p < 0.05$), with an increase in LA and LMP between the times ($D1 = 24h$ and $D5 = 120h$), regardless of the treatments. For the post-thaw semen, there was no treatment effect ($p > 0.05$) on the evaluated kinetic parameters, as well as on the parameters of (LA, LMP, EOS, and IC). In summary, the supplementation of 0.5% and 1.0% of L-Gln and L-Glu for boars provided a positive effect on the productivity parameters of pure semen, but not on cooled or post-thawed semen, thus indicating beneficial metabolic effects for this animal category. Such results highlight the need for continued research to achieve better outcomes in pig reproduction through the use of cooled and post-thawed semen.

Keywords: amino acid, swine breeding, semen, supplement.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Composição nutricional Básica das dietas fornecidas para Suínos machos Reprodutores durante o período experimental42

Tabela 2: Ficha Técnica AminoGut (L- Glutamina e L- Ácido Glutâmico).....43

Tabela 3: Média e erro padrão da média (EPM), dos parâmetros testiculares de cachaços de quatro linhagens comerciais (A, B, C e D) independente dos tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Glutamina e L- Ácido Glutâmico)46

Tabela 4: Média e erro padrão da média (EPM), dos parâmetros testiculares de cachaços de quatro linhagens comerciais (A, B, C e D), considerando separadamente os tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0%) de inclusão de L-Glutamina e L- ácido Glutâmico na dieta47

Tabela 5: Média e erro padrão da média (EPM) de parâmetros de produtividade e qualidade espermática do sêmen fresco de cachaços que receberam níveis crescente (0,0%. 0,5% e 1,0%) de inclusão de L-Glutamina e L- Ácido Glutâmico na dieta.....49

Tabela 6: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros de morfologia espermática e do teste supra vital do sêmen fresco de cachaços que receberam níveis crescente (0,0%. 0,5% e 1,0%) de L-glutamina e L- Ácido glutâmico na dieta.....54

CAPÍTULO II

Tabela 1: Composição nutricional Básica das dietas fornecidas para Suínos machos Reprodutores durante o período experimentais.....68

Tabela 2: Ficha Técnica AminoGut (L- Glutamina e L- Ácido Glutâmico)69

Tabela 3: Média e erro padrão da média (EPM) dos tratamentos nos ciclos (C1; C2 e C3) para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado de cachaços que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0% de L- Glutamina e L- ácido glutâmico)76

Tabela 4: Média e erro padrão da média (EPM) nos ciclos (C1; C2 e C3) independente do tratamento para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen, de cachaços que receberam dietas contendo níveis de (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L- Gln e L- Glu77

Tabela 5: Média e erro padrão da média (EPM) dos tratamentos nos tempos de armazenamento (D1= 24h e D5= 120h) para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) dos aminoácidos L- Glutamina e L- ácido glutâmico.....79

Tabela 6: Média e erro padrão da média (EPM) do tempo de armazenamento independente do tratamento para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L- Glutamina e L- ácido glutâmico).....82

Tabela 7: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros cinéticos de acordo com a coleta (C1; C2 e C3) e os tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0%) do sêmen pós descongelado de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0% de L- Gln e L- Glu)86

Tabela 8: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros Lesão de membrana (LMP), Lesão de acrossoma (LA), Estresse Oxidativo do Sêmen (EOS) e Lesão de Cromatina (LC) do sêmen pós descongelado de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0% de L- Glutamina e L- ácido glutâmico)88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	L - Glutamina.....	16
2.2	L - Ácido Glutâmico	18
2.3	Aminoácido L - glutamina e L - Ácido Glutâmico na nutrição de suínos	20
2.4	Congelamento do sêmen suíno, efeitos danosos a célula espermática e possível participação dos aminoácidos para manutenção da qualidade espermática no pós descongelamento	26
3	REFERÊNCIAS	30

CAPÍTULO I - PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN FRESCO DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA.....38

1	INTRODUÇÃO.....	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Localização e estrutura da área experimental, animais e tratamentos	41
2.2	Avaliação morfológica dos testículos	44
2.3	Avaliação de parâmetros de produtividade e qualidade espermática	44
2.4	Análise estatística	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4	CONCLUSÃO.....	58
5	REFERÊNCIAS	59

CAPÍTULO II - DURABILIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN RESFRIADO E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN PÓS DESCONGELADO DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA.....66

1	INTRODUÇÃO.....	66
2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1	Localização e estrutura da área experimental, animais e tratamentos	67
2.2	Coleta e avaliação do sêmen para processamento	70
2.3	Diluição e coleta de amostras do sêmen resfriado	70
2.4	Análise de durabilidade, Lesão de membrana, Lesão de acrossoma e estresse oxidativo do sêmen resfriado entre 15°C e 18°C	71

2.5	Determinação da População alvo (Amostra Branco), Avaliação de Integridade de Acrossoma, Integridade de membrana e Avaliação do Estresse Oxidativo do Sêmen	71
2.6	Diluição e coleta de amostras do sêmen para congelamento	73
2.7	Análises Estatísticas.....	74
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4	CONCLUSÃO.....	91
5	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

A produção e exportação de suínos do Brasil tem ocupado lugar de destaque no cenário nacional e internacional, como reflexo dos avanços conquistados na nutrição dos animais, na ambiência, no melhoramento genético e na utilização das biotecnologias da reprodução, dentre elas, destaca-se a inseminação artificial com sêmen resfriado.

No Brasil, a proporção de acasalamento por inseminação artificial (I.A.) é 95%, semelhante à dos outros maiores produtores de suínos, assim como na União Europeia, que é o segundo maior produtor mundial e apresenta o mesmo percentual que o Brasil, que ocupa o quarto lugar (Waberski *et al.*, 2019).

O sêmen suíno, processado e conservado na forma líquida entre 15 e 18°C, ganhou mercado e se estabeleceu como o principal meio utilizado na inseminação artificial a campo na reprodução dessa espécie, visto que tem se mostrado eficiente com os atuais parâmetros de qualidade adotados para o processamento do sêmen, bem como os níveis de fertilidade alcançados, possibilitando assim o bom desempenho produtivo e reprodutivo na suinocultura moderna.

Sendo assim, a maioria das inseminações artificiais (I.A.) ocorre utilizando sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C por um período de até cinco dias (Bianchi *et al.*, 2011), diferente das demais espécies, como a bovina, na qual é comumente utilizada a criopreservação.

A criopreservação espermática é uma das principais biotecnologias da reprodução, pois permite o armazenamento do sêmen por tempo indeterminado, o que facilita a difusão genética de reprodutores superiores e torna possível o transporte seminal entre regiões geograficamente distantes (Veerkamp e Beerda, 2007; Andrade *et al.*, 2019; Yáñez-Ortiz *et al.*, 2022).

No entanto, a utilização da inseminação artificial a campo com sêmen suíno criopreservado ainda é um desafio a ser vencido atualmente, pois características inerentes à célula espermática desta espécie são dadas como fatores que contribuem para a impossibilidade de uso desta biotecnologia de reprodução, com a mesma eficiência quando comparada ao uso de sêmen líquido conservado a temperaturas entre 15 e 18°C.

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre diferentes aspectos do processo de criopreservação de sêmen suíno (Toniolli *et al.*, 2017; Guimarães *et al.*, 2018). Essas pesquisas têm buscado resultados que possibilitem aumentar os índices de fertilidade do sêmen em programas de inseminação artificial com o uso de sêmen criopreservado.

Na produção de suínos, pesquisadores têm utilizado uma variedade de elementos como suplemento na dieta ou como crioprotetor, na tentativa de obter resultados que possam contribuir para melhorar os parâmetros quantitativos e qualitativos do sêmen fresco, resfriado ou do sêmen pós-descongelado.

Os aminoácidos L-glutamina (Gln) e o L-ácido glutâmico (Glu) têm ganhado notoriedade no meio científico, pois são vistos com potencial para serem incorporados em dieta de suínos machos reprodutores, com a finalidade de se obter melhoras nos parâmetros de qualidade espermática do sêmen fresco, resfriado e criopreservado, devido a atuarem de forma versátil no metabolismo animal.

De acordo com Briassouli *et al.* (2012), os aminoácidos desempenham um papel crucial na síntese de proteínas, desencadeando cascatas de sinalização que regulam vários aspectos do metabolismo energético e servem como precursores importantes em vias metabólicas.

Também é relatado por Salmon *et al.* (2017) que a incorporação de moléculas, como o colesterol e os aminoácidos, em protocolos de criopreservação do sêmen suíno, pode aumentar a proteção da membrana espermática e a viabilidade dos espermatozoides nesses procedimentos.

El-Sheshtawy *et al.* (2008) sugerem que os aminoácidos (AAs) são moléculas carregadas, sendo possível que interajam, eletrostaticamente, com os grupos fosfato dos fosfolipídios da MP do espermatozoide, formando, assim, uma camada sobre a superfície da célula, protegendo-a contra choques térmicos.

Assim, essa proteção pode contribuir para manter a integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides, durante a criopreservação (Ugur *et al.*, 2020).

Diante do exposto, a hipótese desta tese é que a suplementação na dieta dos aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico melhore os parâmetros quantitativo e qualitativo do sêmen fresco, do sêmen resfriado e do sêmen criopreservado de suínos reprodutores machos, bem como reduza os danos ocasionados pelo estresse oxidativo.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros de produtividade e qualidade espermática do sêmen puro, durabilidade e qualidade espermática do sêmen resfriado e qualidade espermática do sêmen pós-descongelado de 24 suínos machos reprodutores, suplementados com níveis crescentes de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 L - Glutamina

A glutamina é um L - α -aminoácido contendo cinco carbonos; seu peso molecular é 146,15 kDa e sua composição elementar compreende carbono (41,09%), hidrogênio (6,90%), oxigênio (32,84%) e nitrogênio (19,17%) (Cruzat *et al.*, 2018).

A glutamina tem dois grupos amino, nomeadamente o grupo α - amino e o grupo amida de cadeia lateral facilmente hidrolisável, e essas características permitem que a glutamina desempenhe o papel de transportador de nitrogênio e de NH₃ (Cruzat *et al.*, 2018).

Uma característica importante da glutamina é que, no pH fisiológico, o grupo carboxil deste aminoácido é carregado negativamente e o grupo amino é carregado positivamente, resultando em carga líquida zero. Essa característica o coloca como sendo um aminoácido neutro.

Silva (2024) cita que, enquanto os polares (não carregados ou neutros) são aminoácidos solúveis em água, eles se ionizam em condições normais, com exceção da serina. Os aminoácidos polares são: glicina, cisteína, serina, tirosina, treonina, glutamina e asparagina.

Nos últimos anos, o aminoácido L – glutamina tem sido frequentemente reportado em pesquisas científicas que buscam elucidar pontos desconhecidos que envolvem a nutrição animal. Essas pesquisas têm demonstrado o importante papel desse aminoácido em inúmeros eventos metabólicos no organismo.

Dentre esses eventos metabólicos, pode-se citar a importante participação da glutamina na recuperação de animais doentes ou que passaram por algum tipo de desafio metabólico.

Uma gama de trabalhos tem sido publicados reafirmando que a síntese endógena de glutamina não atende à demanda do corpo humano em condições catabólicas, como no câncer (Altman *et al.*, 2016), sepse (Kao *et al.*, 2013), infecções (Rogerio *et al.*, 2007), cirurgias (Flaring *et al.*, 2003), traumas (Rodas *et al.*, 2012), bem como durante exercício físico intenso e prolongado (Leite *et al.*, 2016).

Nessas condições de desafios metabólicos, a glutamina passa a exercer papel importante como um aminoácido condicionalmente essencial, promovendo efeitos positivos para o organismo.

Com a intensificação dos estudos com a utilização da glutamina nos últimos anos, foram inúmeras as descobertas que sustentam o papel versátil deste aminoácido no metabolismo animal.

Cruzart *et al.* (2014) apontam que, em quase todas as células, a glutamina pode ser usada como substrato para a síntese de nucleotídeos (purinas, pirimidinas e aminoácidos), fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), antioxidantes e muitas outras vias biossintéticas envolvidas na manutenção da integridade e função celular.

A glutamina, além de ser precursor na síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas biologicamente importantes, é considerada o principal substrato energético, utilizado em altas taxas em células de proliferação rápida, como enterócitos e leucócitos, e atua na doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese e no transporte de amônia entre os tecidos (Cruzart *et al.*, 2009).

A glutamina também é um aminoácido proteínogênico, ou seja, um aminoácido que é incorporado às proteínas e representa 5 a 6% dos aminoácidos ligados (Roth, 2008).

A partir desse entendimento, a realidade mudou nos últimos anos, pois um maior número de pesquisas nas mais variadas áreas da ciência tem sido reportado com a utilização da glutamina e, conseqüentemente, novas descobertas são publicadas sobre a participação deste aminoácido em inúmeras reações metabólicas no organismo animal, fato este que tem o colocado em evidência.

A glutamina foi inicialmente classificada como um aminoácido não-essencial, uma vez que pode ser sintetizada pela enzima glutamina sintetase (GS), a partir do glutamato e do ácido glutâmico (Buchman, 2001).

Com as novas descobertas, a classificação da glutamina passou a ser questionada, em virtude de se entender que a capacidade de síntese da glutamina não atendia à demanda do corpo em situações de desafios metabólicos, sendo necessário, nessas condições, um aporte nutricional deste aminoácido.

Em uma nova classificação, recentemente, o United States Department of Agriculture in Report Dietary Guideline Advisory Committees (USDA – DGAC, 2010) agrupa os aminoácidos da seguinte maneira: Aminoácidos Essenciais ou Indispensáveis (Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano e Valina); Aminoácidos Condicionalmente Essenciais (Arginina, Cisteína, Glutamina, Glicina, Prolina e Tirosina); Aminoácidos Não essenciais ou Dispensáveis (Alanina, Ácido Aspártico, Asparagina, Ácido Glutâmico e Serina).

Entre os 20 aminoácidos detalhados no código genético, a glutamina fornece o melhor exemplo da versatilidade do metabolismo dos aminoácidos e da função imunológica (Cruzart *et al.*, 2018).

A glutamina é o aminoácido mais abundante e versátil do corpo, e é de fundamental importância para o metabolismo intermediário, troca de nitrogênio interorgânico via amônia (NH₃), transporte entre tecidos e homeostase do pH (Cruzart *et al.*, 2018).

Hamed *et al.* (2022) reafirmam que a glutamina, um aminoácido condicionalmente essencial, exerce efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios.

É relatado também por Nur *et al.* (2011) que, após o estresse oxidativo, a glutamina se torna o substrato para a biossíntese da glutathione reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático estabelecido.

Além disso, foi demonstrado que a glutamina evita a ativação de NF-kB liderada por ROS, diminuindo assim a transcrição a jusante de genes pró-inflamatórios, evitando a tempestade de citocinas e danos ao DNA (Hamed *et al.*, 2022).

Cruzart *et al.* (2018) relatam que a glutamina é fornecida rotineiramente como um componente da suplementação nutricional clínica para pacientes pré e pós-operatórios, e também para muitos atletas de elite, para restaurar as funções imunológicas.

Sendo assim, com as inúmeras evidências reportadas na literatura, fica demonstrado o papel importante deste aminoácido em apoio ao bom funcionamento do organismo animal, principalmente em condições de desafios metabólicos.

No entanto, Cruzart *et al.* (2018) afirmam que, embora existam evidências crescentes em apoio aos efeitos imunomediadores da suplementação de glutamina, ainda permanecem diversas questões e considerações específicas.

2.2 L - Ácido Glutâmico

O glutamato, ou L-ácido glutâmico, é um aminoácido de propriedades ácidas que compõe diversos tipos de proteínas dos seres vivos. Trata-se de um aminoácido não essencial ou natural, isto é, por ser produzido a partir de outros compostos celulares. É representado pela fórmula química C₅H₉NO₄ e possui um ácido carboxílico como radical na sua estrutura (Salinas, 2014).

Em relação à sua polaridade, o ácido glutâmico é classificado como sendo um aminoácido que é carregado negativamente, assim como o ácido aspártico.

De acordo com Newsholme *et al.* (2003), sua carga negativa permite a estabilização de proteínas, mas o impede de atravessar facilmente as membranas celulares, e transportadores de Glu são encontrados em baixa densidade na membrana plasmática, com exceção de células especializadas, como as do sistema nervoso central, fígado, intestino e rim.

Quando analisado sobre sua afinidade com a água, o ácido glutâmico é classificado juntamente com: arginina, lisina, ácido aspártico, glutamina, asparagina, histidina, serina e treonina, como sendo um aminoácido hidrofílico, ou seja, que tem afinidade e se dissolve com facilidade em água.

O Glu ($C_5H_9NO_4$) está presente em grandes quantidades nos órgãos e tecidos do corpo vivo (Yamaguchi e Ninomiya, 2000) e foi isolado pela primeira vez em 1866 pelo alemão Ritthausen, mediante hidrólise ácida de gliadina, um composto do glúten (Rath e Airoidi, 2021).

Com o passar do tempo e com os avanços das pesquisas, foi possível produzir o glutamato em grande escala. Atualmente, o Glu é produzido, principalmente, por fermentação de açúcares oriundos da cana-de-açúcar, beterraba, mandioca, milho e outras fontes de glicose.

De acordo com Maluly *et al.* (2021), todas as bactérias gram-positivas corineformes (*Corynebacterium*, *Corynebacterium glutamicum*) são responsáveis pela produção do L-Glu, que também pode ser sintetizado por microrganismos dos gêneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, etc., em pequenas quantidades por fungos como *Aspergillus terreus* e *Ustilago maydis*.

Como citado anteriormente, o aminoácido glutamato, ou ácido glutâmico, é classificado como sendo um aminoácido não essencial, por ser capaz de ser sintetizado no próprio organismo.

No organismo, o glutamato é sintetizado e metabolizado mediante a atuação das enzimas denominadas aminotransferases; estas enzimas catalisam as reações de transaminação e desaminação. Tais reações são descritas a seguir.

A transaminação ocorre quando há transferência do grupamento α -amino de uma molécula de aminoácido (AA) ao α -cetaglutarato, liberando o α -cetoácido. O α -cetaglutarato ao ser aminado doa sua dupla ligação de oxigênio, se convertendo em Glu, produto final da maioria das transaminações. Assim, o Glu atua como doador específico dos grupos aminos para diversas vias biossintéticas ou de excreção. O Glu pode participar de nova reação de transaminação, doando o grupamento amino recebido ao oxaloacetato, retornando ao estado de α -cetaglutarato e formando o aspartato, integrante do ciclo da ureia (Nelson e Cox, 2014).

Na mitocôndria hepática ocorre a desaminação oxidativa, catalisada pela enzima glutamato desidrogenase. O Glu, ao reagir com uma molécula de água e de NAD(P), tem como produtos resultantes α -cetaglutarato, NAD(P)H, um íon de hidrogênio e amônio livre, sendo este último fonte do primeiro nitrogênio da ureia (Nelson e Cox, 2014).

As reações de transaminação e desaminação, catalisadas pelas aminotransferases, são livremente reversíveis.

A catálise de conversão de Glu em Gln, que são intercambiáveis, é mediada pela glutamina-sintetase (Obled, 2003), e ocorre quando o Glu e ATP reagem para formação de γ -glutamyl-fosfato, que se combina à amônia livre produzida nos tecidos, gerando Gln e fosfato inorgânico (Nelson e Cox, 2014).

Como citado no tópico anterior, a síntese de glutamina pela GS depende da disponibilidade de glutamato. O glutamato, por sua vez, é sintetizado a partir do 2-oxoglutarato NH_4 , pela ação da glutamato desidrogenase, ou ainda pelo catabolismo de outros aminoácidos, como os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), principalmente a leucina (Tan *et al.*, 2017).

Outro ponto importante, citado por Sakomura *et al.* (2014) é que, na via do glutamato, a glutamina é importante para a síntese de glutathiona, o mais abundante antioxidante celular do organismo animal. O muco e o complexo de junção, que protegem o epitélio intestinal, são ricos em glicoproteínas que são sintetizadas a partir de glucosamina-6-fosfato, de cuja síntese participa a glutamina.

Outras funções do Glu foram descritas como a participação na síntese de moléculas bioativas como a glutathiona (GSH), do neurotransmissor γ -aminobutirato (GABA) e da ativação de receptores gustativos (Curi *et al.*, 2007; Burrin *et al.*, 2008).

Isso posto, pode-se observar aqui neste tópico, o papel de suma importância do ácido glutâmico para o metabolismo, pois, apesar deste ser classificado como um aminoácido não essencial, as pesquisas aqui referenciadas mostram suas particularidades e sua participação nas diferentes vias metabólicas, contribuindo positivamente para o funcionamento do organismo.

2.3 Aminoácido L - glutamina e L - Ácido Glutâmico na nutrição de suínos

A busca pela máxima eficiência produtiva e reprodutiva de suínos tem levado ao aperfeiçoamento nas formulações de dietas para atender às diferentes fases e estados dentro do ciclo de produção.

Pesquisas direcionadas em avaliar o metabolismo e a influência de elementos desde a espermatogênese no macho reprodutor suíno e ovogênese na fêmea reprodutora, bem como até as mais avançadas fases de desenvolvimento desses animais, buscam elucidar pontos obscuros que impossibilitam maiores ganhos produtivos e reprodutivos na suinocultura brasileira.

Dentre os elementos pesquisados, os aminoácidos L-glutamina (Gln) e o L-ácido glutâmico (Glu) têm ganhado notoriedade no meio científico, em função da versatilidade que exercem no metabolismo animal.

De acordo com BriassoulI *et al.* (2012), os aminoácidos desempenham um papel crucial na síntese de proteínas, desencadeando cascatas de sinalização que regulam vários aspectos do metabolismo energético e servem como precursores importantes em vias metabólicas.

Santos *et al.* (2019) reafirmam que se pode admitir a condicionalidade de essenciais, em razão da capacidade de síntese endógena não ser compatível para manter o crescimento e o equilíbrio de nitrogênio corporal.

De acordo com Wu (2013), a Glutamina é um aminoácido essencial para neonatos (incluindo o humano e o suíno), adultos sob estresse (por exemplo, estresse térmico, queimaduras e infecções) e animais reprodutores (machos e fêmeas).

Oliveira *et al.* (2006) enfatizam que o apropriado manejo nutricional em suínos reprodutores é uma importante ferramenta para maximizar a produtividade e melhorias nos índices de fertilidade do plantel.

Quando o adequado manejo nutricional não é negligenciado, Diedrich *et al.* (2014) afirmam que estarão assegurados os processos de maturação fisiológica, bioquímica e comportamental que ocorrem até a puberdade, o que irá refletir em espermatogênese normal, expressão da libido, qualidade e quantidade de ejaculado obtido.

Lin Y *et al.* (2017) constataram que leitões com RCIU no pós-natal apresentam desenvolvimento testicular prejudicado, com redução do número de células germinativas, volume testicular, volume de sêmen e menos espermatozoides por ejacular no pós-natal comparados aos leitões de crescimento normal.

Auler *et al.* (2017) também reafirmam que há uma associação entre peso ao nascer e peso e/ou volume testicular, sendo constatada em varrascos neonatos e adultos.

Zhu *et al.* (2018) concluíram que a suplementação com glutamina durante a gestação média (84-100 dias) diminuiu a variação do peso ao nascer e o número de leitões com o crescimento intrauterino retardado.

Rezaei *et al.* (2013) também registraram resultados positivos no grupo suplementado com glutamina, obtendo menor proporção de leitões de baixo peso em comparação com grupos não suplementados.

Nas fases que sucedem a gestação, o desmame é considerado um período crítico da produção, pois esse período é marcado por inúmeras mudanças, dentre elas, fisiológicas, metabólicas e ambientais; essas mudanças podem acarretar perdas significativas de produção.

Sobre essas mudanças, Campbell *et al.* (2013), Satessa *et al.* (2020) e Blavi *et al.* (2021), relatam que se observa o aumento na mortalidade, nos índices de diarreia, além do desempenho abaixo da média.

A suplementação na dieta com os aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico tem apresentado resultados consistentes nessa fase de produção, mitigando os efeitos prejudiciais decorrentes dos desafios enfrentados nesse período.

É relatado na literatura que, assim como a arginina, a glutamina isolada ou associada a outros aminoácidos ajuda na digestão e absorção de nutrientes, além de melhorar o sistema imunológico de leitões desmamados (Xiong *et al.*, 2019).

Caldara *et al.* (2010) avaliaram a influência da glutamina sobre o turnover do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados sobre seu processo de renovação e, assim, concluíram que a suplementação de 1% de glutamina nessa fase de criação acelerou o turnover do carbono da mucosa intestinal.

Na fase de reprodução, ainda são tímidas as pesquisas com suplementação dos aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico para compor dietas de machos suínos reprodutores. No entanto, as poucas pesquisas que abordaram o assunto têm demonstrado resultados promissores para esta categoria animal.

Salinas (2014) constatou em sua pesquisa que os varrões alimentados com ração-padrão + 1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico, durante o período experimental, apresentaram, em média, 12,13% mais volume de ejaculado, em comparação com os animais alimentados somente com ração-padrão. A autora justifica o resultado sugerindo que pode ter ocorrido o aumento da capacidade das células de captar água para o meio intracelular, o que pode ser induzido pelo uso da ração com adição de glutamina, favorecendo, assim, maior volume.

O aumento do volume celular é retratado em estudos com suplementação deste aminoácido para animais que passaram por algum desafio metabólico e após a suplementação com Gln, melhores resultados referentes à síntese proteica foram observados. A explicação é sustentada pelo fato de o transporte de Gln, dependente de Na^+ , influenciar a entrada de água e aumento do volume celular e induzir vias de sinalização para síntese proteica.

Não diferente, no período de reprodução, mais especificamente no período gestacional, são relatadas inúmeras alterações metabólicas e maior demanda nos requerimentos nutricionais da fêmea reprodutora.

Essas mudanças estão relacionadas diretamente com o perfil de exigências nutricionais da fêmea, o qual é determinado pela demanda para manutenção, ganho materno e crescimento fetal (Solà-Oriol e J. Gasa, 2017).

Constantemente, dietas convencionais formuladas para porcas em gestação não atendem às suas demandas em proteínas e minerais, e são nessas condições de carência nutricional que o animal pode enfrentar condições catabólicas com subsequente perda de produção.

Rezai *et al.* (2013) enfatizam que o balanço de aminoácidos e vitaminas durante a gestação deve ser adequado de acordo com cada fase, pois estes são os principais nutrientes durante a vida embrionária e fetal que atuam na regulação da sobrevivência e desenvolvimento do conceito.

Mellagi *et al.* (2022) ressaltam que existem algumas recomendações quanto ao manejo de condição corporal a serem seguidas para a realização da primeira inseminação, sendo de suma importância para assegurar o desempenho reprodutivo e a longevidade, nas quais preconiza-se que a leitoa esteja com peso entre 130 e 150 kg e que seu crescimento corporal durante a primeira gestação tenha um ganho de peso de 35 a 40 kg, para, assim, conseguir chegar ao primeiro parto com reservas corporais suficientes e estar apta a desenvolver sua primeira lactação.

O crescimento intrauterino reduzido, já mencionado anteriormente, é um exemplo que ocasiona perdas na produção suinícola brasileira, pois é constatado com frequência na produção animal, e esse fato é atribuído dentre os inúmeros fatores ao inadequado manejo nutricional, bem como, à evolução genética que proporcionou maior prolificidade das porcas.

Wang *et al.* (2017) relatam que o crescimento e desenvolvimento embrionário e fetal foram limitados devido a diminuição do fluxo sanguíneo por feto, diminuindo assim a eficiência placentária.

Para assegurar o aumento no fluxo sanguíneo e melhorar a eficiência placentária, estudos apontam que a utilização de L-Gln e L-ácido Glu tem se mostrado positiva para esse fim na nutrição de porcas.

No intestino delgado da porca gestante, a glutamina é utilizada para sintetizar citrulina e arginina. A citrulina é convertida posteriormente em arginina em praticamente todos os tipos de células fetais e maternas, incluindo a placenta e as células endoteliais vasculares (Wu *et al.*, 2010).

Campos *et al.* (2012) e Wientjes *et al.* (2013) relatam que há estudos em que a arginina e os membros da sua família (glutamina, glutamato, prolina, aspartato, asparagina, ornitina e citrulina) possuem um importante papel na vascularização e no desenvolvimento placentário, especialmente em marrãs.

É relatado que a suplementação simultânea de arginina e glutamina na ração de porcas em gestação melhora significativamente o desempenho reprodutivo das porcas primíparas (Wu *et al.*, 2011). Isso ocorre em virtude que os dois aminoácidos regulam a síntese proteica por ativarem a produção de poliaminas e a via sinalizadora do mTOR (mammalian target of rapamycin).

A sinalização dependente de mTOR pode ser iniciada no músculo esquelético a partir da ligação de fatores de crescimento (como o IGF-I), hormônios (como a insulina) e nutrientes, tais como os aminoácidos leucina e glutamina, aos receptores do tipo tirosina quinase (RTK) presentes na membrana plasmática. Após essa ligação, a PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) é ativada, o que acarreta a fosforilação de AKT (protein kinase B) que, por sua vez, irá fosforilar mTOR (Fang *et al.*, 2013).

A quinase mTOR se associa a raptor (regulatory associated protein of mTOR) e GβL (G protein β -subunit-like protein), acarretando a formação do complexo denominado mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1).

Tal complexo tem como alvos principais S6K (70 kDA ribosomal protein S6 kinase) e 4EBP1 (eukaryotic initiation fator 4E-binding protein 1). A quinase S6K, após ser ativada pelo mTORC1, estimula a tradução através da fosforilação do S6, um polipeptídio ribossômico. Além disso, há outra forma pela qual a mTORC1 consegue induzir a tradução: através da fosforilação inibitória do 4E-BP1, um regulador negativo do fator de iniciação da tradução eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) (Hara *et al.*, 1998; Arthur e Cooley, 2012; Gumucio e Mendias, 2013).

Em geral, os estudos com suplementação dietética, principalmente de aminoácidos, durante a gestação, proporcionam melhora nos índices produtivos e reprodutivos de suínos, levando ao reconhecimento da arginina e glutamina como aminoácidos essenciais para gestação de leitoas e porcas (NRC, 2012).

Na fase de lactação, assim como a gestação dos animais de produção, é um período em que a fêmea reprodutora necessita receber atenção especial nos aspectos nutricionais, visto que é caracterizado por um período de alta demanda energética para manutenção e produção de leite para nutrir de forma satisfatória o neonato.

Ricci *et al.* (2018) citam que o balanço energético negativo ocorre pela mobilização das reservas corporais, devido à alta demanda nutricional na lactação, pois as necessidades energéticas aumentam nas primeiras semanas, influenciadas pelo tamanho da leitegada.

De acordo com Mellagi *et al.* (2022), o tamanho da leitegada aumenta do primeiro ao quinto parto, sendo assim, o que se espera é que haja um maior número de ovulações e de capacidade uterina.

Sendo assim, como o consumo nutricional não atende as necessidades de produção de leite de uma leitegada numerosa, as fêmeas precisam mobilizar as reservas corporais (Close *et al.*, 2001).

De acordo com Nelson e Cox (2014), o catabolismo é a fase de degradação do metabolismo, na qual moléculas de nutrientes orgânicos (carboidratos, gorduras e proteínas) são convertidas em produtos finais menores e mais simples (como ácido láctico, CO₂ e NH₃).

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no sangue humano e a diminuição das concentrações circulantes de glutamina está geralmente associada a estados catabólicos e maus resultados em uma variedade de pacientes (Tjader *et al.*, 2007). Informações semelhantes a essa, também foram constatadas em pesquisas com as diferentes espécies de animais, sendo a glutamina o aminoácido com maior proporção, principalmente no músculo esquelético.

Sob condições de elevada degradação proteica, a glutamina pode atuar como regulador metabólico, para aumentar a síntese e reduzir o catabolismo protéico (Zavarize *et al.*, 2010).

O uso da glutamina por outros órgãos do corpo aumenta em resposta ao estresse e, como consequência, o conteúdo plasmático diminui drasticamente. Assim, para restabelecer a concentração, a glutamina existente no músculo esquelético é lançada no sangue, sendo responsável pela manutenção das concentrações plasmáticas e por prover outros tecidos com esse aminoácido (Zavarize *et al.*, 2010).

A condição corporal da reprodutora suína tem sido avaliada com atenção no período de gestação, visto que obter reservas corporais nesse período é de fundamental importância para mitigar problemas ocasionados no período de lactação, ou seja, um bom nível de reservas corporais, para que, assim, a produção de leite e a manutenção da gestação não sejam impactadas negativamente.

Mellagi *et al.* (2022) e Rodoigues *et al.* (2013) consideram que o baixo desempenho reprodutivo no segundo ciclo pode estar associado à carência nutricional durante a primeira lactação, sendo que essa carência pode não ter suprido de forma adequada as demandas energéticas da fêmea, contribuindo assim de forma negativa para sua manutenção durante a fase de lactação, acarretando na mobilização de suas próprias reservas corporais e resultando em excessiva perda de peso.

Kitt *et al.* (2004) verificaram que o fornecimento de 2,5% de glutamina às porcas aumentou o teor de glutamina no leite. Esse resultado mostra que, com a suplementação deste aminoácido, é possível melhorar a disponibilidade dele, tanto para os processos metabólicos da matriz quanto para uma maior oferta à prole.

Wu (2005) concluiu que uma suplementação de glutamina durante a lactação poderia prevenir a perda de massa muscular das matrizes suínas, já que a glutamina e o glutamato, mesmo representando de 10 a 15% do total de aminoácidos em muitos alimentos e coprodutos

industriais (Li *et al.*, 2010) e o milho e a soja não fornecerem um padrão ideal de aminoácidos para porcas em lactação.

Isso posto, claramente, a suplementação dos aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de suínos nas diferentes fases e estados dentro do ciclo de produção, tem apresentado resultados positivos para o desempenho produtivo e reprodutivo dessa espécie, demonstrando contribuição favorável em condições de anabolismo, bem como atuando de forma positiva nos processos que minimizam ou inibem o catabolismo proteico.

2.4 Congelamento do sêmen suíno, efeitos danosos a célula espermática e possível participação dos aminoácidos para manutenção da qualidade espermática no pós descongelamento.

O congelamento do sêmen suíno é uma prática que vem sendo desenvolvida há anos; no entanto, pouco se avançou em relação à manutenção dos parâmetros de qualidade das células espermáticas, quando comparados aos padrões alcançados com a utilização do sêmen suíno resfriado a temperaturas que variam entre 15° e 18°C.

No processo de criopreservação de sêmen suíno, a preocupação é voltada para a membrana plasmática, visto que ela serve como escudo de proteção contra os agentes causadores dos efeitos danosos ao espermatozoide suíno, os quais são mais suscetíveis a danos na membrana plasmática quando comparados aos de outras espécies.

A membrana plasmática desempenha um papel relevante na capacidade fertilizante das células, sofrendo modificações ao longo do processo de espermatogênese, bem como no trânsito e armazenamento no epidídimo, no trato genital feminino e na capacitação e penetração do oócito (Vicente-Carrillo *et al.*, 2016).

Espermatozoides de espécies como humanos, coelhos e macacos têm menor sensibilidade ao choque térmico durante o processo de congelação. Acredita-se que essa maior resistência se deva a uma melhor relação entre a proporção colesterol/fosfolípidios e a uma maior quantidade de ácidos graxos saturados em suas membranas quando comparados a espécies mais suscetíveis, como bovinos, ovinos e suínos (Lone, 2018).

A membrana plasmática da célula espermática de suínos possui diferenças em sua estrutura em comparação com outras espécies de animais, como apontado por Johnson *et al.* (2000). As principais diferenças na MP incluem: menor porcentagem de moléculas de colesterol e sua distribuição de maneira assimétrica; maior quantidade de glicerol na monocamada interna do que na externa; uma quantidade menor de fosfatidilcolina e maior de fosfatidiletanolamina

e esfingomielina; diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolipídeos, com poucas duplas ligações do tipo cis.

O perfil lipídico das células espermáticas difere entre as espécies e, até mesmo, entre indivíduos da mesma espécie, o que pode propiciar maior ou menor integridade de membrana plasmática e interferir na criotolerância da célula. Isso se deve à modificação dos componentes e da organização dos lipídios presentes na membrana durante o processo de congelamento (Cabrera, 2017).

Bernecic *et al.* (2019) afirmam que o colesterol tem grande importância na célula espermática, desde a proteção da integridade das membranas até a capacitação dos espermatozoides.

Shi *et al.* (2018) relatam que a produção do colesterol começa cedo na formação da célula espermática, em que primariamente ocorre a expressão de genes colesterogênicos nas células germinativas dos machos.

Fica evidente que a menor relação colesterol/fosfolipídios na membrana plasmática de espermatozoide suíno é um dos fatores que têm impossibilitado a conquista de melhores resultados na criopreservação do sêmen suíno.

Silva *et al.* (2015) afirmam que o processo de criopreservação em suínos pode levar a alterações na composição de proteínas e carboidratos, o que pode perturbar a estrutura da membrana e reduzir a viabilidade espermática.

A descoberta do papel biológico dos aminoácidos (AAs) na prevenção de danos à célula surgiu a partir da observação de uma variedade de plantas que são capazes de acumular o aminoácido prolina em resposta à temperatura fria (Tonhati, 2018).

Tem sido relatado que alguns AAs protegem diversos tipos de células animais contra o estresse causado pela congelamento, incluindo as células espermáticas (Sangeeta *et al.*, 2015). Assim, essa proteção pode contribuir para manter a integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides durante a criopreservação (Ugur *et al.*, 2020).

Vários aminoácidos foram detectados no plasma seminal e utilizados com sucesso como agentes crioprotetores não penetrantes na criopreservação de espermatozoides de mamíferos. Como exemplo dos AAs estudados, estão a glutamina e a prolina (Davoodian *et al.*, 2017), a metionina (Çoyan *et al.*, 2010), a betaína (Attia *et al.*, 2019), a cisteína (El-Sheshtawy *et al.*, 2008), a alanina e a glicina (Fagundes *et al.*, 2010).

No entanto, ainda não está bem esclarecido o papel exato desses aminoácidos na fisiologia da célula espermática, bem como os mecanismos de atuação durante o processo de congelamento e no pós-descongelamento.

O choque frio espermático e o estresse oxidativo podem induzir a apoptose espermática e aumentar a expressão de fatores apoptóticos, como Bax e caspase-3 (Liu *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2022).

De Mercado *et al.* (2009) demonstram que a L-glutamina tem a capacidade de crioprotetger o espermatozoide suíno, melhorando a motilidade espermática pós-descongelamento, e pode ser usada como um substituto parcial do glicerol nos diluentes de congelamento.

Os estudos mais recentes mostraram que mais de 70% dos espermatozoides suínos não sobrevivem à criopreservação (Caamaño *et al.*, 2021; Bustani e Baiee, 2021). Além disso, as taxas de parto diminuíram em 20-30% e o tamanho das ninhadas caiu em dois a três leitões quando se usou sêmen suíno criopreservado em comparação com as taxas alcançadas quando se usou preservação líquida (Kaeoket *et al.*, 2008). Isso se deve à formação de cristais que ocorre durante a criopreservação, seguida de desidratação que acaba afetando a taxa de sobrevivência do espermatozoide suíno (Almubarak *et al.*, 2021).

Quanto ao mecanismo de atuação na criopreservação, El-Sheshtawy *et al.* (2008) sugerem que os aminoácidos (AAs) são moléculas carregadas, sendo possível que interajam eletrostaticamente com os grupos fosfato dos fosfolípidios da MP do espermatozoide, formando, assim, uma camada sobre a superfície da célula, protegendo-a contra choques térmicos.

Já Sangeeta *et al.* (2015) relatam que alguns aminoácidos atuam por meio de efeito osmótico, prevenindo a formação de cristais de gelo no meio extracelular.

Martins-Bessa *et al.* (2007) também relatam que a capacidade dos AAs em melhorar a crio-sobrevivência dos espermatozoides tem sido relacionada com suas propriedades metabólicas e crioprotetoras, oxidantes ou osmorregulativas.

Apesar de ter sido verificado o efeito crioprotetor sobre espermatozoides, em diversas espécies, os mecanismos de crioproteção espermática, conferidos pelos AAs, assim como a função de aminoácidos livres na fisiologia do espermatozoide, ainda não foram totalmente esclarecidos (Fagundes *et al.*, 2010).

Os espermatozoides de suínos, em particular, são muito suscetíveis a danos peroxidativos devido a seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e baixas concentrações de colesterol em sua membrana plasmática (Mandal *et al.*, 2014; Yeste, 2015).

Inúmeros estudos demonstram que o baixo uso do sêmen suíno congelado deve-se ao fato de que este apresenta redução nas taxas de concepção e está associado a leitegadas menores

(2-3 leitões, em média), sendo tais resultados atribuídos aos danos de estrutura e funcionalidade da célula espermática, causados durante o processo de criopreservação (Khalifa *et al.*, 2014).

Tais danos estruturais não estão limitados apenas à membrana plasmática da célula espermática, mas também são responsáveis por comprometer a integridade da cromatina e a função mitocondrial, envolvendo ainda a degradação de mRNAs, agindo de forma prejudicial sobre a ação de importantes proteínas (Yeste, 2016).

Diante disto, sabe-se apenas que o processo de criopreservação pode promover relevantes alterações na fluidez da membrana plasmática, resultando em modificações do perfil lipídico nos espermatozoides da espécie suína, tornando-os mais sensíveis ao choque térmico (Am-In *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015).

As principais causas são transições de fase lipídica, cristalização de gelo e fluxos de água induzidos por osmótica. Isso resulta em reorganizações da membrana, que podem perturbar a integridade, estrutura e função da membrana (Jovičić *et al.*, 2020).

Além dessas particularidades, a espécie suína ainda apresenta uma grande variação entre raças e entre ejaculados de diferentes indivíduos da mesma raça (Zaja *et al.*, 2016), e entre ejaculados do mesmo varrasco (Techakumphu *et al.* 2013).

As informações mencionadas são corroboradas por Passarelli *et al.* (2020), Pedrosa *et al.* (2021) e Torres *et al.* (2022), os quais afirmam que estudos recentes no âmbito da andrologia suína demonstraram que, até mesmo ejaculados com alta qualidade e viabilidade, variam na capacidade de tolerar o processo de criopreservação.

Por fim, são inúmeras as pesquisas realizadas e protocolos desenvolvidos ou testados; no entanto, até o momento, nenhum resultado demonstrou ser capaz de manter a taxa de sobrevivência dos espermatozoides suínos e padrões de qualidade próximos àqueles do sêmen resfriado, ficando assim, o uso do sêmen suíno criopreservado limitado a casos específicos.

3 REFERÊNCIAS

ALI AL AHMAD, M. Z. et al. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. **Reproduction in domestic animals**, v. 43, n. 4, p. 429-436, 2008.

ALMUBARAK, Areeg M. et al. Washing solution and centrifugation affect kinematics of cryopreserved boar semen. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 65-75, 2021.

ALTMAN, Brian J.; STINE, Zachary E.; DANG, Chi V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 619-634, 2016.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1129-1136, 1983.

AM-IN, N. et al. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 897-903, 2011.

ANDRADE, A. F. C. et al. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. **Na. Bras. Reprod. Anim.**, v.43, n.2, p.89-96, 2019.

ATTIA, Y. A. et al. Effect of supplementation with trimethylglycine (betaine) and/or vitamins on semen quality, fertility, antioxidant status, DNA repair and welfare of roosters exposed to chronic heat stress. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 547, 2019.

BERNECIC, N.C. Cholesterol can be reliably used to monitor cholesterol efflux from capacitating mammalian spermatozoa. **Scientific Reports**, v.9, p.1-12, 2019.

BIANCHI, I. B. I. et al. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39, 2011.

BRIASSOULI, E.; BRIASSOULIS, G. Glutamine randomized studies in early life: the unsolved riddle of experimental and clinical studies. **Journal of Immunology Research**, v. 2012, n. 1, p. 749189, 2012.

BUCHMAN, A. L. Glutamine: commercially essential or conditionally essential? A critical appraisal of the human data. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2001.

BUSTANI, G. S.; BAIEE, F. H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary World**, v. 14, n. 5, p. 1220, 2021.

CAAMAÑO, J. N. et al. Post-thaw sperm quality and functionality in the autochthonous pig breed Gochu Asturcelta. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1885, 2021.

CABRERA T. **Correlação entre o perfil lipídico do sêmen de garanhões e a qualidade espermática pósdescongelamento**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2017.

CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. **Cryobiology**, v. 25, n. 3, p. 244-255, 1988.

ÇOYAN, K. et al. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research in veterinary science**, v. 89, n. 3, p. 426-431, 2010.

CROWE, J. H. Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. **Membranes, metabolism and dry organisms**, p. 188-209, 1986.

CRUZAT, Vinicius et al. Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1564, 2018.

CRUZAT, V. F. et al. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de medicina do Esporte**, v. 15, p. 392-397, 2009.

CRUZAT, Vinicius F. et al. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 345-352, 2014.

DAVOODIAN, N. et al. Effects of Two Amino Acids on Motion Parameters and Enzymatic Antioxidant Activity of Freeze-Thawed Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.59, p.49-56, 2017.

DE MERCADO, E. et al. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 149-157, 2009.

DONG, R. et al. Effects of riboflavin on boar sperm motility, sperm quality, enzyme activity and antioxidant status during cryopreservation. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 4, p. 1509-1518, 2022.

EL-SHESHTAWY, R. I.; EL-SISY, G. A.; EL-NATTAT, W. S. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. 2008.

FAGUNDES, B. et al. Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 279-284, 2010.

FLÄRING, U. B. et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clinical science**, v. 104, n. 3, p. 275-282, 2003.

FLIPSE, R. J.; ALMQUIST, J. O. Diluters for bovine semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. 1956.

GUIMARÃES, D. B. et al. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. e38250, 2018.

HAMED, M. A. et al. Glutamine restores testicular glutathione-dependent antioxidant defense and upregulates NO/cGMP signaling in sleep deprivation-induced reproductive dysfunction in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, p. 112765, 2022.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, 2000.

JOVIČIĆ, Mar.; CHMELÍKOVÁ, E.; SEDMÍKOVÁ, M. Cryopreservation of boar semen. **Czech Journal of Animal Science**, v. 65, n. 4, 2020.

KAEOKET, K. et al. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Thai J Agri Sci**, v. 41, n. 1-2, p. 1-9, 2008.

KAO, Christina et al. Alterations in glutamine metabolism and its conversion to citrulline in sepsis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 12, p. E1359-E1364, 2013.

KHALIFA, Tarek et al. Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. **Macedonian Veterinary Review**, v. 37, n. 1, p. 5-34, 2014.

KHLIFAOU, M. et al. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: na approach of the mechanism of action at spermatozoa level. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 138-149, 2005.

KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D. J.; LEPOCK, J. R. Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. **Cryobiology**, v. 25, n. 2, p. 121-130, 1988.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUMDER, G. C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v. 42, p. 21-27, 2001.

LEE YONGSEUNG, L. Y. S. et al. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. 2015.

LEITE, Jaqueline Santos Moreira et al. l-glutamine and l-alanine supplementation increase glutamine-glutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 41, n. 8, p. 842-849, 2016.

LI, Y. et al. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 59, n. 4, p. 159-165, 2003.

LIU, Chang-He et al. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. **Animal reproduction science**, v. 164, p. 47-56, 2016.

LONE, S. A. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.192, p.1-5, 2018.

MANDAL, R.; BADYAKAR, D.; CHAKRABARTY, J. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. **Advances in Andrology**, v. 2014, 2014.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Theriogenology**, v. 68, n. 8, p. 1088-1096, 2007.

MELLAGI, A. P. G. et al. Desafios da síndrome do segundo parto em suínos. **Revista Suíno Brasil 3º Trimestre 2022**, Porto Alegre, p. 76-82, 2022.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, p. 153-163, 2003.

NOGUCHI, M. et al. Improvement of growth rates of plant cell cultures. In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application: Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section B, held at the University of Munich, Germany September 6–10, 1976. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, p. 85-94, 1977.

NUR, E. et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 11, p. 1412-1417, 2011.

PASSARELLI, S. M. et al. Effects of different equilibration times at 5 C on boar sperm cryotolerance. **Animal reproduction science**, v. 219, p. 106547, 2020.

PEDROSA, Ana Carolina et al. Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. **Theriogenology**, v. 174, p. 60-72, 2021.

PHETUDOMSINSUK, Kanittha et al. Freezability of Thai native crossbred horse semen in different extenders. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 2, p. 105-114, 2009.

RENARD, P. et al. Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine. **Cryobiology**, v. 33, n. 3, p. 311-319, 1996.

RODAS, P. C. et al. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. **Clinical science**, v. 122, n. 12, p. 591-597, 2012.

ROGERO, M. M. et al. Effect of glutamine supplementation and in vivo infection with *Mycobacterium bovis* (bacillus calmette-guerin) in the function of peritoneal macrophages in early weaned mice. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, p. 173-174, 2007.

ROTH, E. Nonnutritive effects of glutamine. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2025S-2031S, 2008.

SALINAS, J. A. P. **Suplementação de glutamina: ácido glutâmico na dieta de varrões**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SALMON, V. M. et al. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. **Animal Reproduction Science**, v.177, p.1-11, 2017.

SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; SETCHELL, B. P.; MAXWELL, W. M. C. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 4, p. 347-358, 1998.

SANGEETA, Sharon et al. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Animal reproduction science**, v. 161, p. 82-88, 2015.

SHI, Jin-Feng et al. Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 1, p. 705-713, 2018.

SILVA, C. G. et al. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 90-94, 2015.

SILVA, J. A. S. **Efeito das condições extremas de temperatura e pressão nas propriedades estruturais e vibracionais dos dipeptídeos glicil-L-fenilalanina e glicil-L-ácido glutâmico**.

2024. Tese (Doutorado em física) – Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

TAN, Hayden Weng Siong; SIM, Arthur Yi Loong; LONG, Yun Chau. Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 338, 2017.

TECHAKUMPHU, Mongkol et al. Improvement of semen quality by feed supplement and semen cryopreservation in swine. **Success in artificial insemination– Quality of semen and diagnostics employed**, p. 17-37, 2013.

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D. B.; BARROS, T. B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência a congelação em ejaculados de diferentes varrões. **Revista Brasileira de reprodução Animal**, v. 41, p. 297-311, 2017.

TONHATI, R. **L-prolina no alívio do estresse térmico em tomateiro cultivado em ambiente protegido**. 2018. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo/USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

TORRES, M. A. et al. Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. **Biology of Reproduction**, v. 106, n. 1, p. 213-226, 2022.

TRIMECHE, A. Y. J. M. et al. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 181-191, 1999.

UGUR, M. R. et al. Amino acids of seminal Plasma associated with freezability of bull sperm. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.7, p.1-14, 2020.

UNITED STATES. DIETARY GUIDELINES ADVISORY COMMITTEE. **Dietary guidelines for Americans, 2010**. US Department of Health and Human Services, US Department of Agriculture, 2010.

VEERKAMP, R. F.; BEERDA, B. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 68, p. S266-S273, 2007.

VICENTE-CARRILLO, A. et al. Membrane stress during thawing elicits redistribution of aquaporin 7 but not of aquaporin 9 in boar spermatozoa. **Reproduction in domestic animals**, v. 51, n. 5, p. 665-679, 2016.

WABERSKI, Dagmar et al. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, v. 137, p. 2-7, 2019.

WANG et al. Physiological alterations associated with intrauterine growth restriction in fetal pigs: causes and insights for nutritional optimization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 9, p. 897-904, 2017.

WU, G. et al. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. **Journal of animal science**, v. 88, n. suppl_13, p. E195-E204, 2010.

WU, Guoyao et al. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. **Journal of animal science**, v. 89, n. 7, p. 2017-2030, 2011.

YÁNEZ-ORTIZ, I. et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106904, 2022.

YESTE, M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, p. 71-79, 2015.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Molecular reproduction and development**, v. 84, n. 9, p. 802-813, 2017.

ŽAJA, I. Ž. et al. Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among boar breeds and hybrid genetic traits. **Animal reproduction science**, v. 170, p. 75-82, 2016.

CAPÍTULO I

PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN FRESCO DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE L- GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA

PRODUTIVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN FRESCO DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA

Resumo: A suinocultura brasileira ocupa lugar de destaque nos contextos nacional e internacional, resultado de investimentos na cadeia produtiva, bem como do uso eficiente da inseminação artificial com sêmen resfriado entre 15°C e 18°C. Nesse cenário, são necessárias pesquisas que busquem elementos para compor dietas que promovam o aumento da produtividade de sêmen e a melhoria das células espermáticas dos suínos. Os aminoácidos L-glutamina (L-Gln) e L-ácido glutâmico (L-Glu) apresentam potencial de uso para esse fim, visto que possuem ação benéfica para o organismo. Este estudo objetivou avaliar a produtividade e a qualidade espermática do sêmen fresco de 24 suínos machos reprodutores, de quatro linhagens comerciais (A, B, C e D), com idade média de (24,5±4,40 meses), que receberam dietas contendo níveis de (0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Gln e L-Glu). Durante 120 dias, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metálicas e distribuídos em um delineamento em blocos casualizados (DBC), com três tratamentos (inclusão de 0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Gln e L-Glu na dieta) e quatro repetições (blocos) com dois cachacos por unidade experimental. Diariamente, foram fornecidos 2,5 kg de ração padrão da central (RPC) em um único trato, com suplemento fornecido *on top* conforme cada tratamento. Para a avaliação da biometria testicular dos animais, foram realizadas duas medições (M1 = dia 15 e M2 = dia 115), com a tomada das medidas de comprimento e largura dos testículos direito (CTD e LTD) e esquerdo (CTE e LTE), com auxílio de paquímetro. Para avaliação de produtividade e qualidade espermática, durante 120 dias, a fração rica em espermatozoide dos ejaculados foi coletada duas vezes por semana pelo método semiautomático em manequim fixo, sendo imediatamente seguida para análise em sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), considerando os parâmetros: volume do ejaculado (mL), concentração de espermatozoides (%), concentração de espermatozoides viáveis (%), motilidade (%), patologia (%), espermatozoides em bilhões por coleta (bi/C), espermatozoides em bilhões por mês (bi/M) e número de doses (2×10^9). Na avaliação da morfologia espermática pela técnica do esfregaço corado, foram avaliados os parâmetros: Espermatozoides normais (%); Total de patologias (%); Defeito de cabeça (%); Defeito de acrossoma (%); Defeito de peça intermediária (%); Cauda dobrada enrolada (%); Cauda dobrada com gota citoplasmática proximal (%); Cauda dobrada com gota citoplasmática distal (%); Gota citoplasmática proximal (%); Gota citoplasmática distal (%) e Cabeça isolada (%). No teste supravital, os parâmetros espermatozoides vivos (%) e mortos (%) foram quantificados. Os resultados obtidos para os parâmetros testiculares indicaram maiores médias para a linhagem (D) em relação às demais (A, B e C). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) ao avaliar separadamente os tratamentos, mas houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as medições (M1) e (M2), independentemente dos tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0%). Na produtividade, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos, destacando-se os tratamentos (0,5 e 1,0%) em relação ao tratamento (0,0%), entre as linhagens, com destaque para a linhagem (B), além de diferenças entre os ciclos. Na morfologia espermática houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre linhagens com os resultados se alternando entre elas. Concluiu-se neste estudo que a suplementação de 0,5% e 1,0% dos aminoácidos L-Gln e L-Glu na dieta de cachacos proporcionou resultados significativos ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e o grupo controle, na avaliação de produtividade e qualidade espermática do sêmen fresco, sendo que os melhores resultados foram atribuídos aos animais tratados, demonstrando o efeito positivo do suplemento para essa categoria animal.

Palavras-chave: aminoácido, ejaculado, nutrição, reprodutor suíno, suplemento.

SPERM PRODUCTIVITY AND QUALITY OF FRESH SEMEN FROM BOARS SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT LEVELS OF L-GLUTAMINE AND L-GLUTAMIC ACID IN THE DIET

Abstract: Brazilian pig farming occupies a prominent place in both national and international contexts, as a result of investments in the production chain, as well as the efficient use of artificial insemination with semen cooled between 15°C and 18°C. In this scenario, research is needed to seek elements to compose diets that promote increased semen productivity and the improvement of boar sperm cells. The amino acids L-glutamine (L-Gln) and L-glutamic acid (L-Glu) show potential for use in this regard, as they have beneficial effects on the body. This study aimed to evaluate the productivity and sperm quality of fresh semen from 24 male breeding pigs of four commercial lines (A, B, C, and D), with an average age of (24.5±4.40 months), who received diets containing levels of (0.0%, 0.5%, and 1.0% of L-Gln and L-Glu). For 120 days, the animals were housed individually in metal cages and distributed in a randomized block design (RBD), with three treatments (inclusion of 0.0%, 0.5%, and 1.0% of L-Gln and L-Glu in the diet) and four repetitions (blocks) with two pens per experimental unit. Daily, 2.5 kg of central standard feed (CSF) were provided in a single feeding, with the supplement given on top according to each treatment. For the evaluation of the testicular biometry of the animals, two measurements were taken (M1 = day 15 and M2 = day 115), measuring the length and width of the right testicle (RTL and RWL) and left testicle (LTL and LWL) with the aid of a caliper. For the evaluation of sperm productivity and quality, over a period of 120 days, the sperm-rich fraction of the ejaculates was collected twice a week using a semi-automatic method on a fixed mannequin, and was immediately followed by analysis in a CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) system, considering the parameters: ejaculate volume (mL), sperm concentration (%), viable sperm concentration (%), motility (%), pathology (%), sperm in billions per collection (bi/C), sperm in billions per month (bi/M), and number of doses (2x10⁹). In the evaluation of sperm morphology using the stained smear technique, the following parameters were assessed: Normal spermatozoa (%); Total pathologies (%); Head defect (%); Acrosome defect (%); Midpiece defect (%); Coiled tail (%); Tail with proximal cytoplasmic droplet (%); Tail with distal cytoplasmic droplet (%); Proximal cytoplasmic droplet (%); Distal cytoplasmic droplet (%) and Isolated head (%). In the supravital test, the parameters of live (%) and dead (%) spermatozoa were quantified. The results obtained for the testicular parameters indicated higher averages for the (D) lineage compared to the others (A, B, and C). There was no statistical difference ($p > 0.05$) when evaluating the treatments separately, but there was a statistical difference ($p < 0.05$) between the measurements (M1) and (M2), regardless of the treatments (0.0%, 0.5%, and 1.0%). In productivity, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between the treatments, with treatments (0.5 and 1.0%) standing out compared to treatment (0.0%), among the lineages, with lineage (B) being highlighted, as well as differences between the cycles. In sperm morphology, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between strains, with the results alternating between them. It was concluded in this study that the supplementation of 0.5% and 1.0% of the amino acids L-Gln and L-Glu in the diet of boars provided significant results ($p < 0.05$) between the treated groups and the control group, in the evaluation of productivity and sperm quality of fresh semen, with the best results attributed to the treated animals, demonstrating the positive effect of the supplement for this animal category.

Keywords: amino acid, ejaculate, nutrition, swine reproductive, supplement.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira, nos últimos anos, tem se mostrado competitiva no mercado nacional e internacional, e vem mantendo-se entre os maiores produtores e exportadores de carne suína do mundo.

O bom desempenho produtivo e reprodutivo de suínos no Brasil é atribuído aos investimentos aplicados no melhoramento genético das linhagens comerciais, no manejo sanitário, na produção de doses de sêmen com alta capacidade de fertilização, no uso da inseminação artificial (IA) com sêmen resfriado e nas pesquisas sobre exigências nutricionais de cada categoria animal.

A inseminação artificial (IA) é praticada mundialmente e é a biotecnologia mais aplicada e eficaz na reprodução de suínos (Waberski *et al.*, 2019). No Brasil, em 2019, considerando o plantel de matrizes em criações tecnificadas, foi estimado que 94,4% do plantel foi inseminado (Viana *et al.*, 2020).

Nesse sentido, fica evidente a importância do bom manejo do macho reprodutor suíno para a obtenção de doses de sêmen com alta capacidade de fertilização na produção.

Waberski *et al.* (2019) relatam que a produção de doses de sêmen com alta capacidade de fecundação é um grande desafio na suinocultura moderna.

Atualmente, na nutrição de suínos machos reprodutores, pesquisadores têm direcionado seus estudos na busca de elementos ou compostos que possam proporcionar o aumento da produtividade do sêmen, juntamente com a melhoria da qualidade das células espermáticas, pois, a formulação de uma dieta para este fim, ainda é vista como um desafio a ser vencido na atualidade.

Neste contexto, os aminoácidos L-glutamina e L- ácido glutâmico se apresentam com potencial para serem utilizados nas formulações de dietas para suínos machos reprodutores, pois são inúmeras as pesquisas que mostram que esses aminoácidos agem de forma dinâmica no metabolismo animal, promovendo inúmeros benefícios para o organismo animal.

A glutamina é classificada como aminoácido não essencial, no entanto, estudos têm afirmado categoricamente que, a síntese endógena de glutamina não atende às demandas do corpo em condições, como sepse (Kao *et al.*, 2013); traumas (Rodas *et al.*, 2012), bem como, exercício físico intenso e prolongado (Leite *et al.*, 2016) e em animais reprodutores machos e fêmeas (Wu, 2013).

Hamed *et al.* (2022) afirmam que a glutamina é um aminoácido condicionalmente essencial, exerce efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Em quase todas as células, a

glutamina pode ser usada como substrato para a síntese de nucleotídeos (purinas, pirimidinas e aminoácidos), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH), antioxidantes e muitas outras vias biossintéticas envolvidas na manutenção da integridade e função celular (Curi *et al.*, 2016; Cruzart *et al.*, 2014).

Por outro lado, o glutamato é precursor da síntese de ornitina em macrófagos e monócitos, o que o conecta com o ciclo da ureia e resulta na formação de arginina, substrato para enzima óxido nítrico sintetase (Newsholme *et al.*, 2003).

Wu *et al.* (1995) afirmam que o glutamato pode substituir a glutamina em diversos papéis metabólicos, como na geração de energia e síntese de aminoácidos.

Em suas pesquisas, Zhang *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2022) enfatizam que esses aminoácidos são indispensáveis à regulação do metabolismo do nitrogênio e à homeostase corporal.

Isso posto, objetivou-se com este estudo avaliar a produtividade e a qualidade espermática do sêmen fresco de 24 suínos machos reprodutores, suplementados com diferentes níveis de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE), Recife, sob o número de aprovação 1671090822.

2.1 Localização e estrutura da área experimental, animais e tratamentos

Esse estudo foi realizado em uma Unidade de Disseminação de Genética (UDG) pertencente a Empresa Bretanha Importação e Exportação Ltda, localizada na Cidade de São Carlos, Estado de Santa Catarina – SC.

O município possui clima mesotérmico e está a uma altitude média de 260 metros acima do nível do mar. Está localizado geograficamente a latitude de 27°05'00" ao Sul do Trópico de Capricórnio, e longitude de 53°01'00" ao Oeste do Meridiano de Greenwich (Oliveira *et al.*, 2019).

A presente pesquisa foi desenvolvida durante 120 dias. Nesse período, a pesquisa foi conduzida dentro de um galpão de alvenaria, coberto com telhas de fibrocimento, piso em concreto armado e com divisórias de gaiolas metálicas com dimensões apropriadas (240cm x 70cm x 130 cm) para alojar individualmente os animais, sendo essas equipadas com bebedouro do tipo nipple, comedouro do tipo calha e sistema de fornecimento de ração semiautomático.

Para a realização da coleta da fração rica em espermatozoides dos ejaculados, o referido galpão contava com uma sala de coleta com quatro divisórias em alvenaria (Box de coleta), piso cerâmico e equipada com 4 manequins fixos em aço inox. Tal estrutura tornava possível a realização do procedimento de coleta de sêmen de quatro animais simultaneamente.

O galpão contava também com um laboratório para análise de sêmen equipado com microscópio óptico e de contrastes, computador, estufa de circulação de ar forçada, máquina envasadora de doses de sêmen, conservadora, refrigerador, osmose, balança de precisão e placa aquecedora.

Toda a estrutura do referido galpão contava com sistema automático de monitoramento de temperatura, umidade relativa do ar e ventilação.

Neste estudo, foram utilizados 24 suínos machos reprodutores saudáveis (*Sus scrofa domesticus*) de 4 linhagens comerciais com idade média de $(24,5 \pm 4,40)$ meses) que foram distribuídos individualmente em gaiolas metálicas em um delineamento de blocos casualizados (DBC), com 3 tratamentos (0,0 %; 0,5% e 1,0% de inclusão de L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico na dieta), 4 repetições (Blocos) com 2 animais cada repetição.

Durante todo período experimental (120 dias), os animais foram alimentados com ração padrão da central (RPC) a base de milho e farelo de soja (Tabela 1), fornecida pela Empresa Polinutri Alimentos S/A, CNPJ: 60.210.515/0004-90.

Diariamente, a ração padrão da central (RPC) foi fornecida aos animais às 6:00 h da manhã, na quantidade de 2,5 kg em um único trato e o suplemento L – Glutamina e L – Ácido Glutâmico (AminoGut) (Tabela 2), fornecido pela empresa Ajinomoto do Brasil Industria e Comercio de Alimentos Ltda. CNPJ: 46.344.354/0001-54, foi incluído na ração de forma *on top* de acordo com cada tratamento e o acesso a água pelos animais foi *ad libitum*.

Tabela 1: Composição nutricional Básica das dietas fornecidas para Suínos machos Reprodutores durante o período experimental.

(Continua)

Ingredientes	Dietas Experimentais		
	(RPC) + 0% L- Gln e L- Glu	(RPC) + 0,5% L- Gln e L- Glu	(RPC) + 1,0% L- Gln e L- Glu
Umidade (max)	125g/kg	125g/kg	125g/kg
Proteína Bruta (min)	140g/kg	140g/kg	140g/kg
Extrato Etéreo (min)	30g/kg	30g/kg	30g/kg
Fibra Bruta (max)	75g/kg	75g/kg	75g/kg
Matéria mineral (max)	85g/kg	85g/kg	85g/kg
Cálcio (min)	7.500mg/kg	7.500mg/kg	7.500mg/kg
Cálcio (max)	12g/kg	12g/kg	12g/kg
Fosforo (min)	6500mg/kg	6500mg/kg	6500mg/kg
Lisina (min)	6.500mg/kg	6.500mg/kg	6.500mg/kg

Tabela 1: Composição nutricional Básica das dietas fornecidas para Suínos machos Reprodutores durante o período experimental.

Ingredientes	Dietas Experimentais			(Conclusão)
	(RPC) + 0%	(RPC) + 0,5%	(RPC) + 1,0%	
	L- Gln e L- Glu	L- Gln e L- Glu	L- Gln e L- Glu	
Carnitina (min)	50mg/kg	50mg/kg	50mg/kg	
Metionina (min)	2400mg/kg	2400mg/kg	2400mg/kg	
Sódio (min)	2.300mg/kg	2.300mg/kg	2.300mg/kg	
Ferro (min)	70mg/kg	70mg/kg	70mg/kg	
Cobre (min)	66mg/kg	66mg/kg	66mg/kg	
Manganês (min)	29mg/kg	29mg/kg	29mg/kg	
Zinco (min)	157mg/kg	157mg/kg	157mg/kg	
Iodo (min)	1,1mg/kg	1,1mg/kg	1,1mg/kg	
Selênio (min)	0,35mg/kg	0,35mg/kg	0,35mg/kg	
Cromo (min)	2mg/kg	2mg/kg	2mg/kg	
Vitamina A (min)	8.500UI/kg	8.500UI/kg	8.500UI/kg	
Vitamina D3(min)	1700UI/kg	1700UI/kg	1700UI/kg	
Vitamina E(min)	85UI/kg	85UI/kg	85UI/kg	
Vitamina K3 (min)	2,1mg/kg	2,1mg/kg	2,1mg/kg	
Vitamina B1(min)	3,6mg/kg	3,6mg/kg	3,6mg/kg	
Vitamina B2(min)	8,0mg/kg	8,0mg/kg	8,0mg/kg	
Vitamina B6(min)	5,6mg/kg	5,6mg/kg	5,6mg/kg	
Vitamina B12(min)	37,5mg/kg	37,5mg/kg	37,5mg/kg	
Niacina (min)	44,5mg/kg	44,5mg/kg	44,5mg/kg	
Pantotenato de Cálcio (min)	28,24mg/kg	28,24mg/kg	28,24mg/kg	
Ácido Fólico (min)	2,72mg/kg	2,72mg/kg	2,72mg/kg	
Biotina (min)	0,68mg/kg	0,68mg/kg	0,68mg/kg	
Cloreto de Colina (min)	1.400mg/kg	1.400mg/kg	1.400mg/kg	
Vitamina C (min)	500mg/kg	500mg/kg	500mg/kg	

Fonte: Adaptado da tabela fornecida pela Empresa Polinutri Alimentos S/A (2022).

Tabela 2: Ficha Técnica AminoGut (L- Glutamina e L- Ácido Glutâmico)

Indicação	Aminoácido para todas as espécies animais.		
Características Física	Pó cristalino de coloração branca a amarelo claro		
	Gravidade específica, kg/L 1,5 a 1,6		
Garantia	L- Glutamina, %	10,0	Mínimo
Comercial	L-Ácido Glutâmico, %	10,0	Mínimo
	Matéria seca, %	99,0	Mínimo
	Proteína bruta, %	60,0	Mínimo N x 6,25 (por convenção)
Valores	EB, kcal/kg	3646	
Nutricionais	ED, kcal/kg (suínos)	3617	
	EM, kcal/kg (suínos)	3434	
	EL, kcal/ kg (suínos)	2661	
Registro	Produto isento de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil		

Adaptado: Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda (2021).

2.2 Avaliação morfológica dos testículos

Para avaliação morfológica dos testículos dos animais, foram realizadas duas medições, sendo que a primeira, realizada no décimo quinto dia do período experimental (M1= 15º dia) e a segunda, realizada no centésimo décimo quinto dia do período experimental (M2= 115º dia).

Na realização das medições dos testículos dos animais para obtenção dos parâmetros de morfologia testicular, foram tomadas as medidas de comprimento do testículo direito (CTD), largura do testículo direito (LTD), comprimento do testículo esquerdo (CTE) e largura do testículo esquerdo (LTE), sendo essas medidas realizadas *in vivo* com o auxílio de paquímetro, de acordo com (CBRA, 2013).

Para o cálculo do volume dos testículos direito e esquerdo (VTD e VTE), foi utilizada a fórmula de Bailey *et al.* (1998), descrita no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

$$Vol = 4/3 \times \pi \times (L/2)^2 \times (h/2) \text{ (individual de cada testículo)}$$

Onde:

$$\pi = 3,1416$$

L = largura testicular

h = comprimento testicular

2.3 Avaliação de parâmetros de produtividade e qualidade espermática

Durante os 120 dias de experimento, a fração rica em espermatozoides dos ejaculados foi coletada pelo método semiautomático em manequim fixo e em sala apropriada, com uso de copo térmico contendo filtro de papel para separar a fração gelatinosa e saco plástico para contenção da fração rica do ejaculado, que era imediatamente encaminhada para avaliação no laboratório.

Ao entrar no laboratório, a fração rica dos ejaculados era visualmente avaliada quanto à cor (branco, marfim e marrom claro), aspecto (aquoso, opalescente, leitoso ou cremoso) e, posteriormente, pesada em balança de precisão, com o resultado expresso em mililitros (mL), de acordo com (CBRA,2013).

Em seguida, os parâmetros de motilidade massal (%), volume (mL), patologia (%), espermatozoides normais (%), concentração (milhões [mi/mL]), bilhões de espermatozoides por coleta (bi/C), bilhões de espermatozoides por mês (bi/M), espermatozoides viáveis por dose (%) e número de doses eram avaliados em sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis)- Magavision, Magapor.

Para o cálculo do número de doses, foram utilizados os seguintes dados.

- Peso do ejaculado (mL)
- Concentração do Magavision (mi/mL)
- % de Patologias pelo Magavision
- Espermatozoides viáveis (sem patologias)
- Espermatozoides viáveis por dose pós-cervical: $1,25 \times 10^9$ espermatozoides
- Espermatozoides viáveis por dose cervical: $2,0 \times 10^9$ espermatozoides

Onde:

Espermatozoides viáveis = Peso do ejaculado x Concentração do Magavision - % de Patologias

Número de doses = Espermatozoides totais viáveis / meta de espermatozoides viáveis por dose (1,25 ou 2,0 bi)

Para avaliação de concentração e morfologia espermática, a fração rica do ejaculado foi mensurada na câmara magavision, sendo retirada uma amostra de 100 µL de sêmen com o auxílio de uma pipeta, em seguida foi adicionada a um Eppendorf com 900 µL de solução fisiológica de formol citrato 0,3%.

Posteriormente, 2 µL da mistura sêmen + formol foram depositados na câmara magavision e realizada a leitura em microscópio em contraste de fases de 10x. Ejaculados com até 30% de patologias seguiam para processamento. Estimaram-se também as patologias espermáticas e a porcentagem de espermatozoides vivos ou mortos pelo método de coloração supravital Eosina-Nigrosina de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Para a avaliação de Motilidade massal, foi depositado 50 µL de sêmen entre a lâmina e a lamínula, pré-aquecidas a 37°C, em seguida observado em microscópio em lente de aumento de 4x em contraste de fase, com o resultado expresso em porcentagem, valores abaixo de 70% o sêmen era reprovado.

Para a avaliação da morfologia espermática, adotando o método de coloração Eosina-Nigrosina, foram realizados 2 esfregaços corados de cada amostra coletada em lâminas previamente aquecidas a 37°C. As amostras de sêmen *in natura* foram associadas com solução a base de eosina-nigrosina, sendo que, posteriormente, as lâminas coradas foram analisadas em imersão a um aumento de 1.000x em microscópio óptico, sendo analisadas 200 células espermáticas, como proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Na referida avaliação, foram considerados os seguintes parâmetros: Espermatozoides normais (SptzN%); Total de Patologias (TP%); Defeito de Cabeça (DC%); Defeito de

Acrossoma (DC%); Defeito de Peça Intermediária (DPI%); Cauda Dobrada Enrolada (CDE%); Cauda Dobrada com Gota Citoplasmática Proximal (CDGCP%); Cauda Dobrada com Gota Citoplasmática Distal (CDGCD%); Gota Citoplasmática Proximal (GCP%); Gota Citoplasmática Distal (GCD%) e Cabeça Isolada (CI%). Paralelo a avaliação da morfologia espermática foi realizado o teste supra vital (espermatozoides vivos ou mortos). No teste supra vital utilizando a técnica da lâmina corada com solução a base de eosina-nigrosina, foram contadas 100 células espermáticas de cada lâmina, sendo quantificado o percentual de espermatozoides vivos (V%) e de espermatozoides mortos (M%).

2.4 Análise estatística

Primeiramente, foi utilizado o teste de Shapiro-wilk para avaliar a normalidade dos dados. As medidas dos parâmetros testiculares e volume foram submetidas ao teste t de Student, para verificação da existência de diferenças significativas entre os tratamentos e grupos analisados. Posteriormente, foi feita a análise de variância para verificação da existência de interação entre os tratamentos e o tempo das medições.

Para os dados de produtividade e morfologia espermática, foi realizada a ANOVA com medidas repetidas no tempo. Todos os dados foram submetidos ao programa estatístico R, com os pacotes ggplot2, ggpubr e dplyr (RDevelopment Core Team, 2011). O nível de significância adotado nas análises foi de $P < 0.05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da avaliação da morfologia testicular (Tabela 3) apontam que foi constatada diferença estatística ($p < 0,05$) quando avaliados os parâmetros testiculares (CTD, LTD, CTE, LTE, VTD e VTE) entre as linhagens (A, B, C e D) utilizadas neste estudo.

Tabela 3: Média e erro padrão da média (EPM), dos parâmetros testiculares de cachaaos de quatro linhagens comerciais (A, B, C e D) independente dos tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Glutamina e L- Ácido Glutâmico).

Variável	Linhagem				p-valor
	A	B	C	D	
CTD	13,7±0,3b	13,9±0,2b	14,0±0,1b	15,4±0,3a	<0,001
LTD	9±0,2b	8,6±0,2b	8,2±0,1c	9,7±0,2a	<0,001
CTE	14,1±0,2b	13,7±0,2b	13,9±0,1b	15,4±0,2a	<0,001
LTE	9,1±0,3b	8,5±0,2c	8,3±0,1c	9,9±0,2a	<0,001
VTD	580±36,3b	544±38,6b	497±22,9b	766±47,7a	<0,001
VTE	633±54,1b	525±32,2b	508±29,7b	750±63,2a	<0,001

^{ab} Letras diferentes indicam diferenças estatística ($P < 0,05$). Linhagem (A, B, C e D); CTD= Comprimento do testículo direito; LTD= Largura do testículo direito; CTE= Comprimento do testículo esquerdo; LTE= Largura do testículo esquerdo; VTD= Volume do testículo direito; VTE= Volume do testículo esquerdo.

Murgas (1999) cita que a biometria e a determinação do volume testicular auxiliam na caracterização da puberdade e maturidade sexual em suínos, pois mostram o desenvolvimento testicular do reprodutor e a sua capacidade em produzir espermatozoides.

As médias obtidas neste estudo (Tabela 4) para os parâmetros testiculares avaliados (CTD, LTD, CTE, LTE, VTD e VTE) são diferentes daquelas referenciadas no Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

De acordo com Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (2013), para o comprimento e largura médios para os testículos machos suínos de acordo com a idade, os animais de 12 a 30 meses de idade o comprimento do testículo (cm) seria de 9,7 - 11,0 (8,2 - 12) e a largura do testículo (cm) seria de 5,9 - 7,2 (4,9 - 8,0). Neste estudo, para a mesma faixa etária de idade, os resultados foram superiores às do manual, com medidas de CT variando de 13,7cm a 15,4cm e para LT as médias variaram de 8,2cm a 9,9cm.

Vale ressaltar que nesse estudo foram utilizados animais híbridos de quatro linhagens comerciais e, portanto, os resultados estão em conformidade com estudos anteriores.

Em seu estudo Kamanová *et al.* (2016) cita que evidências indicam, ainda, que animais híbridos apresentam melhor libido, puberdade precoce e maior tamanho de testículos quando comparados a animais de raça pura.

Nesse estudo, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens, sendo que, a linhagem D obteve maiores médias em todos os parâmetros comparada com as demais.

Na (Tabela 4) os resultados mostram que não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) nos parâmetros testiculares avaliados, quando comparados separadamente os tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0% de inclusão de Gln e Glu) na dieta de cachaços.

Tabela 4: Média e erro padrão da média (EPM), dos parâmetros testiculares de cachaços independente da linhagem (A, B, C e D), considerando separadamente os tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0%) de inclusão de L-Glutamina e L- ácido Glutâmico na dieta.

							(Continua)
Variável	M1			M2			p-valor
	AminoGut%			AminoGut%			
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0	
CTD (cm)	13,0±0,2	14,6±0,2	13,0±0,3	14,4±0,4	15,2±0,3	14,6±0,2	0,228
LTD (cm)	8,48±0,4	8,41±0,2	8,33±0,2	9,22±0,4	9,49±0,3	9,19±0,2	0,597
CTE (cm)	13,5±0,4	14,0±0,2	13,6±0,2	14,5±0,4	15,3±0,3	14,6±0,2	0,835
LTE (cm)	8,57±0,3	8,53±0,3	8,21±0,2	9,6±0,4	9,6±0,3	9,25±0,2	0,093
VTD (mL)	511±47,1	546±43,4	473±32,8	652±75,5	727±62,3	649±39,6	0,370

Tabela 4: Média e erro padrão da média (EPM), dos parâmetros testiculares de cachacos independente da linhagem (A, B, C e D), considerando separadamente os tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0%) de inclusão de L-Glutamina e L- ácido Glutâmico na dieta.

(Conclusão)

M1				M2			
Variável	AminoGut%			AminoGut%			p-
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0	valor
VTE (mL)	525±57,3	473±24,8	484±38,1	701±79,0	753±75,6	670±38,8	0,326

^{ab} Letras diferentes indicam diferenças estatística ($P < 0,05$). CTD= Comprimento do testículo direito; LTD= Largura do testículo direito; CTE= Comprimento do testículo esquerdo; LTE= Largura do testículo esquerdo; VTD= Volume do testículo direito; VTE= Volume do testículo esquerdo; M1= 15 dias de experimento e M2= 115 dias de experimento.

Na avaliação dos parâmetros testiculares, considerando separadamente os grupos tratados, os resultados da (Tabela 4) mostram que não houve influência do tratamento nos parâmetros avaliados, indicando que as diferenças entre os grupos tratados não são consideradas relevantes ($p > 0,05$).

Na avaliação do sêmen fresco, os resultados obtidos (Tabela 5) mostram que foi constatado efeito do tratamento ($p > 0,05$) nos parâmetros avaliados, mas houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens para: Concentração de espermatozoides (mi/mL), Concentração de espermatozoides Viáveis (mi/mL), Espermatozoides (bi/C) e Número de Doses produzidas ($[]D = 2 \times 10^9$), também houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ciclos espermáticos para os parâmetros: Concentração de espermatozoides (mi/mL); Concentração de espermatozoides viáveis (mi/mL); Espermatozoides (bi/C) e número de doses produzidas ($D = 2 \times 10^9$).

Atualmente, inúmeras linhagens comerciais de reprodutores suínos de alto potencial genético estão disponíveis no mercado brasileiro, o que tem possibilitado ao produtor escolher qual melhor atende aos seus objetivos de ganhos de desempenho produtivo e reprodutivo.

A produção e seleção de machos reprodutores visando o melhoramento genético obteve um grande destaque a partir da utilização da inseminação artificial (IA) (Broekhuijse *et al.*, 2012). A atividade sexual, o volume e a qualidade do sêmen produzido por esses machos reprodutores tornaram-se características importantes para a IA (Wysokińska e Kondracki, 2014).

Tabela 5: Média e erro padrão da média (EPM) de parâmetros de produtividade e qualidade espermática do sêmen fresco de cachacos que receberam níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) de inclusão de L-Glutamina e L- Ácido Glutâmico na dieta.

		Volume do Ejaculado (mL)						(Continua)	
L		Trat. % de Gln e Glu (C1)		Trat. % de Gln e Glu (C2)		Trat. % de Gln e Glu (C3)			
		0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%		
LA	184±16,5bA	228±35,8aA	281±24,1aA	180±18,3bA	188±24,7bA	266±17,8aA	190±21,0bA	234±30,8aA	261±23aA
LB	160±14,3bB	164±7,8bB	227±27,5aB	134±15,0bB	157±8,0bB	201±23,1aB	128±21,4cB	150±12,3bB	222±26aB
LC	143,0±8,1B	160±14,7B	130±8,5C	144±6,6B	149±11,3B	140±12,4C	165±7,6B	160±17,5B	162±11C
LD	114±15,3cC	198±13,0aB	161±5,2bC	158±30,9bAB	188±8,9aA	153±6,9bC	136±5,5cB	217±7,8aA	182±5,0aC
Concentração de espermatozoides (mi/mL)									
LA	200±21,6bA	275±33,5aB	188±21,0bB	176±22,7bB	240±35,1aB	149±14,4bC	190±18,3bB	178±19,bC	193±21,3bB
LB	335±71,5bB	504±38,8aA	323±54,2bA	254±44,1cA	403±38,4aA	367±49,5aA	309±78,4bA	528±64,8aA	372±38,2aA
LC	295±23,1bB	258±29,1bB	328±36,6aA	235±17,8cA	268±26,8bB	252±23,9bB	268±14,1bA	281±29,2bB	265±36,7bB
LD	365±50,0aA	231±18,6bB	279±17,4bA	241±18,2bA	147±7,1cC	214±12,9bB	215±39,3bA	183±15,1cC	253±13,9bB
Concentração de espermatozoides Viáveis (mi/mL)									
LA	170±17,8b	221±25,1aB	155±16,4bB	151±18,6b	209±30,7aB	120±10,7cB	165±15,6bB	151±16,9bB	156±16,7bB
LB	265±60,0bA	421±29,9aA	273±43,3bA	195±30,8b	332±30,7bA	304±37,5bA	248±71,4bA	437±54,0aA	298±29,3bA
LC	257±20,4aA	216±26,5aB	262±33,0aA	194±15,3b	213±19,3aB	188±21,5bB	224±11,1aA	221±22,3aB	210±32,0aB
LD	273±37,9aA	192±15,4bB	234±16,1aA	142±12,4c	117±6,4cC	169±10,4cB	122±41,6cB	145±12,4cB	206±10,9bB
Motilidade									
LA	84±10,2bB	88±9,4aB	88±8,2aB	80±8,1bB	90±10,2aA	85±6,1abB	82±6,3bB	86±7,4aB	84±5,2bC
LB	98±10,1aA	97±8,1aA	92±7,2aA	87±8,3bA	92±10,1aA	94±10,1aA	89±8,4bA	94±11,1aA	97±9,1aA
LC	86±8,2bB	82±9,3cC	91±5,2aAB	87±6,2bA	85±8,2bB	88±8,2abB	90±6,1aA	86±9,2bB	88±8,2abC
LD	97±6,1aA	85±6,2bBC	89±8,2bAB	84±7,4bA	84±7,1bB	87±7,1bB	83±6,4bB	86±9,1bB	93±9,1aB
Patologia									
LA	14,5±1,4B	17,8±4,1	18,0±1,1	12,9±1,0C	13,3±1,3B	18,9±1,5B	14,7±2,0B	18,7±3,5	18,5±1,3B
LB	20,6±1,7B	15,7±3,7	16,2±0,6	23,0±2,4B	17,3±1,1A	15,8±1,2C	24,6±3,5C	16,8±1,4	19,6±1,2B
LC	13,2±1,1bB	17,7±1,9b	22,5±3,7a	17,7±1,0bC	19,5±1,2bA	28,2±2,8aA	16,0±0,5bB	21,3±1,5b	26,6±3,0aA
LD	25,2±2,2bA	17,0±1,4c	16,5±1,8c	41,6±2,3aA	21,2±1,5bA	21,7±1,2bB	50,4±5,3aA	21,1±1,6b	18,2±0,7bcB

Tabela 5: Média e erro padrão da média (EPM) de parâmetros de produtividade e qualidade espermática do sêmen fresco de cachações que receberam níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0%) de inclusão de L-Glutamina e L- Ácido Glutâmico na dieta.

(Conclusão)

L	Espermatozoides (bi/C)									
	Trat. % de Gln e Glu (C1)					Trat. % de Gln e Glu (C2)				
	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%	1,0%
LA	32,3±2,8bB	57,9±9,0aB	46,1±4,0aB	30,5±3,6b	43,6±7,2aB	34,8±2,6bB	38,1±4,3bAB	45,4±7,1aB	40,2±2,6aB	
LB	51,5±9,3cA	81,3±5,8aA	66,3±7,2bA	33,8±7,5c	62,5±6,1bA	61,9±5,8bA	41,1±7,8cA	71,2±6,1aA	72,3±6,1aA	
LC	40,5±3,1aB	40,8±5,6aC	41,3±4,2aB	32,9±2,7a	38,6±4,4aB	29,9±2,1bB	44,0±3,0aA	40,5±5,2aB	36,8±3,6aB	
LD	37,3±3,6aB	43,3±3,2aC	44,5±2,8aB	34,0±3,0b	26,9±1,5cC	32,1±1,8bB	28,4±4,4cB	39,0±2,9aB	45,5±2,4aB	
Espermatozoides (bi/M)										
LA	369,9±54,6bB	407,0±31,9aB	494,1±66,6aB	332,1±64,1bB	422,6±15,0aA	287,2±39,5bA	462,9±81,7aB	480,3±9,3aA	423,8±50,0aA	
LB	114,7±51,2cC	154,8±24,3bB	118,1±19,4cC	572,8±200aA	111,2±24,5cB	103,1±19,3cB	733,8±31,5aA	124,3±12,0cB	143,4±18,2bB	
LC	603,7±127bA	829,4±26,7aA	718,0±16,1aA	349,7±59,9cB	494,1±10,1cA	336,0±68,6cA	475,5±48,2cB	548,9±15,9bA	406,1±74,0cA	
LD	427,9±56,7bB	427,5±42,1bB	638,9±14,7aA	391,1±69,6bB	225,8±21,2cB	250,5±25,1cA	452,1±10,7bB	448,0±9,1bA	421,9±41,7bA	
Número de Doses ([JD= 2×10 ⁹)										
LA	16,2±1,4cB	29,0±4,5aB	23,1±2,0bB	15,3±1,8cB	21,8±3,3bB	17,5±1,3cB	19,1±2,1bA	22,7±3,5bB	20,1±1,3bB	
LB	25,8±4,6cA	40,6±2,9aA	33,2±3,6bA	16,9±3,7cB	31,3±3,0bA	31,0±2,9bA	20,6±8,9cA	35,6±3,0bA	35,9±2,8bA	
LC	20,3±1,5B	20,4±2,8C	20,7±2,1B	16,4±1,3B	19,3±2,2B	15,0±1,0B	21,7±1,5A	20,3±2,6B	18,0±1,6B	
LD	18,7±1,8aB	21,7±1,6aC	22,3±1,4aB	22,8±6,3aA	13,5±0,7bC	16,1±0,9bB	14,2±2,2bB	19,5±1,4aB	22,8±1,2aB	

^{ab} Letras diferentes indicam diferenças estatística (P < 0,05) na linha.

^{AB} Letras diferentes indicam diferenças estatística (P < 0,05) na coluna.

L= Linhagem (A, B, C e D); Trat= Tratamento; Gln= glutamina; Glu= ácido glutâmico; C= Ciclo (1, 2 e 3).

A avaliação dos parâmetros de qualidade seminal de suínos é de fundamental importância na suinocultura moderna, pois, além de atender aos valores pré-determinados para o processamento e comercialização do sêmen na forma de doses inseminantes, fornece informações relacionadas à saúde do animal, bem como possibilita o acompanhamento do desempenho produtivo do cachaço e a tomada de decisões quanto à sua permanência ou não no ciclo de produção.

De acordo com Oberlender *et al.* (2012), a avaliação do sêmen fresco é, antes de tudo, a etapa mais importante na auditoria do processo de produção de doses de inseminação.

González-Penã *et al.* (2015) relatam que as características mais importantes, no que diz respeito à qualidade do ejaculado, são: volume, motilidade dos espermatozoides, concentração e morfologia espermática.

Na tabela (Tabela 5), pode-se observar que ocorreu diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos e entre as linhagens dentro dos ciclos para todos os parâmetros de produtividade contidos na referida tabela.

Os resultados apresentados na (Tabela 5) para volume, motilidade e patologias espermáticas estão dentro das características desejáveis preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). No entanto, as médias obtidas para número total de espermatozoides ficaram abaixo (60×10^9) das especificadas como desejáveis no referido manual, com médias variando de ($26,99 \times 10^9$) a ($81,30 \times 10^9$).

No parâmetro volume do ejaculado, quando analisados os resultados, pode-se observar que, no C1, C2 e C3, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos e, na maioria das vezes, com os maiores valores sendo atribuídos aos tratamentos 0,5% e 1,0% em comparação ao tratamento controle (0,0% de inclusão de L-Gln e L-Glu) na dieta de cachaços.

Trabalhando com a suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de cachaços, Salinas (2014) constatou que varrões alimentados com ração-padrão + 1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico, durante o período experimental, apresentaram, em média, 12,13% mais volume de ejaculado em comparação com os animais não tratados. A autora justifica o resultado sugerindo que pode ter ocorrido o aumento da capacidade das células de captar água para o meio intracelular, que pode ser induzida pelo uso da ração com adição de glutamina, favorecendo assim, maior volume.

Nesse estudo, sugere-se também que os resultados com as maiores médias de volume do ejaculado para os grupos tratados tenham sido influenciados pela adição do suplemento, visto que, ao ser transportada para dentro da célula, a glutamina promove maior captação de água para o meio intracelular, consequentemente aumentando o volume celular.

Ao comparar o desempenho entre as linhagens para o parâmetro volume do ejaculado, foi observado que também houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens dentro dos ciclos e as maiores médias foram atribuídas para a linhagem (A) quando comparada com as demais (B, C e D).

Ross (2023) cita que, antes de se pensar na linhagem do animal a ser introduzido numa criação comercial de suínos, deve-se atentar para os fatores que permitem ao animal exaltar suas qualidades naturais desejadas. Sabe-se que nenhuma linhagem será ótima, assim como nenhum animal será eficiente, se as condições gerais da criação, referentes à sanidade, alimentação, instalações e manejo, não forem adequadas.

Na avaliação da concentração de espermatozoides (mi/mL), os resultados apresentados (Tabela 5) mostram que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos e entre as linhagens dentro de cada ciclo espermático, sendo que no (C1, C2 e C3), no tratamento (0,5% de gln e glu) as médias são maiores ($p < 0,05$) do que as do grupo controle, com destaque para a linhagem (B), que obteve média entre (254 a 504 mi/mL), enquanto que, nas demais linhagens, a média variou entre (149 a 365 mi/mL).

O grupo controle obteve maiores médias ($p < 0,05$) no ciclo 1 para a linhagem D, e nos demais ciclos, na mesma linhagem não diferiu ($p > 0,05$) do tratamento 1,0%.

Seguindo nossa avaliação e discussão dos resultados da (Tabela 5), pode-se observar uma dinâmica nos resultados de todos os parâmetros avaliados, sendo a diferença estatística ($p < 0,05$) constante entre os tratamentos dentro dos ciclos, bem como a presença de diferença estatística ($p < 0,05$) entre os parâmetros avaliados para as linhagens.

Os resultados para motilidade e patologias espermáticas, como mencionado anteriormente, estão dentro das características desejáveis preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução animal (CBRA, 2013).

Para o parâmetro espermatozoides bilhões por coleta (bi/C) o tratamento controle não difere ($p > 0,05$) no ciclo 1 nas linhagens (C e D), e no ciclo 2 com maior média, difere estatisticamente ($p < 0,05$) do tratamento 1%, na linhagem (C), sendo maior que o (0,5%) na linhagem (D).

No parâmetro bilhões por mês (bi/M), os resultados seguem semelhantes às avaliações anteriores, com médias maiores ($p < 0,05$), alternando-se nos grupos tratados em comparação ao tratamento controle, e, em alguns casos, esses resultados mudam em favor do grupo controle, como apresentado no (C2), onde o tratamento controle teve maior média ($p < 0,05$) em comparação com os tratados no parâmetro bilhões por mês (bi/M) na linhagem D.

Sobre a produção animal, Almeida (2021) cita que fatores como a temperatura, o fotoperíodo e a nutrição podem impactar negativamente na qualidade de vida, levando a um desajuste na homeostase que pode refletir na reprodução desses animais.

Deve-se salientar que animais em desconforto térmico podem reduzir seu desempenho reprodutivo (Mesquita *et al.*, 2011), resultando em alterações no comportamento sexual (Hodel *et al.*, 2021), na qualidade espermática, no tamanho testicular e epididimário (Hodel *et al.*, 2021; Eloy, 2007) e, por consequência, reduzir a qualidade da formação e armazenamento da célula espermática (Hodel *et al.*, 2021).

Em quase todas as células, a glutamina pode ser usada como substrato para a síntese de nucleotídeos (purinas, pirimidinas e aminoácidos), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH), antioxidantes e muitas outras vias biossintéticas envolvidas na manutenção da integridade e função celular (Curi *et al.*, 2016; Cruzart *et al.*, 2014).

Nesse sentido, as inúmeras utilidades da L-glutamina e do L-ácido glutâmico para o organismo reforçam a hipótese de que o aporte nutricional desses aminoácidos pode ter contribuído para a proliferação das células espermáticas.

Como esperado, em função dos resultados das avaliações que tiveram maiores médias nos parâmetros que fazem parte da base de cálculo para o número de doses inseminantes, foi possível constatar o reflexo de maiores resultados ($p < 0,05$) para o número de doses nos grupos tratados nas linhagens (A e B), já no ciclo 1, para as linhagens (C e D), o grupo controle não diferiu dos grupos tratados ($p > 0,05$).

Na sequência de apresentação e discussão dos resultados, estão contidos na (Tabela 7) os resultados da avaliação da morfologia espermática pelo teste do esfregaço corado.

Os resultados (Tabela 6) mostram que não foi constatada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos nos parâmetros avaliados de acordo com cada ciclo espermático, mostrando com isso que a suplementação de L-Gln e L-Glu na dieta de suínos machos reprodutores, em estado ativo de produção, não causou efeito nos parâmetros de morfologia espermática, de acordo com o resultado das avaliações neste estudo.

Tabela 6: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros de morfologia espermática e do teste supra vital do sêmen fresco de cachacos que receberam níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L-glutamina e L- Ácido glutâmico na dieta.

Espermatozoides Normais (%)										(Continua)	
Linagem	Trat % (C2)			Trat % (C3)			P-Valor				
	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%	T	L	C		
LA	82±1,4	77,4±2,3	79,9±1,3	79,5±2,1	80,8±1,6	77,8±1,2	0.5276	0.2877	0.2235		
LB	72,2±4,3	75,2±3,2	80,1±1,1	69,8±2,9	80,2±2,1	79,8±2,1					
LC	74,3±2,8	78,7±1,6	70,4±2,8	81,8±1,0	77,7±1,8	73,5±4,7					
LD	58,1±2,6	73±1,7	77,3±0,8	55±4,4	70,7±1,8	79,4±1,3					
Total de Patologias (%)											
LA	18,0±1,4	22,6±17,0	20,1±1,3	20,5±2,1	19,2±1,6	22,2±1,2	0.6252	0.4514	0.0602		
LB	27,8±4,3	23,8±3,6	19,9±1,1	30,2±2,9	19,8±2,1	22,2±2,1					
LC	25,7±2,8	21,3±1,6	29,6±2,8	18,2±1,0	22,3±1,8	27,1±4,6					
LD	41,9±2,6	27,0±1,7	22,7±0,8	45,0±4,4	29,3±1,8	20,6±1,3					
Defeito de Cabeça (%)											
LA	0,8±0,2	1,7±0,7	1,4±0,3	0,9±0,3	0,5±0,2	0,6±0,1	0.9177	0.4455	0.0802		
LB	0,8±0,3	1,7±0,4	1,4±0,3	1,1±0,6	1,3±0,4	0,8±0,3					
LC	2,1±0,5	1,0±0,1	1,8±0,3	1,6±0,2	0,5±0,2	1,1±0,3					
LD	1,8±0,4	2,3±0,6	1,3±0,2	1,0±0,3	1,5±0,2	1,2±0,2					
Defeito de Acrossoma (%)											
LA	1,9±0,2AB	2,3±0,6A	1,5±0,2	0,8±0,1B	1,1±0,2	0,8±0,1	0.0804	0.0336	0.5381		
LB	1,4±0,5B	2,0±0,3A	1,2±0,2	2,0±0,7A	0,8±0,2	1,0±0,2					
LC	2,3±0,4A	1,3±0,2B	1,4±0,2	0,6±0,2B	0,5±0,1	0,7±0,2					
LD	2,4±0,6A	1,7±0,3AB	1,9±0,2	1,3±0,4B	1,0±0,2	1,3±0,2					
Defeito de Peça Intermediária (%)											
LA	1,0±0,2	1,7±0,6	1,0±0,1	0,8±0,1	1,0±0,3	0,6±0,1	0.0514	0.2247	0.0537		
LB	0,8±0,3	1,8±0,4	1,2±0,2	1,0±0,4	1,4±0,4	1,3±0,4					
LC	2,1±0,4	1,9±0,4	1,9±0,2	1,2±0,2	1,3±0,4	0,8±0,1					
LD	2,5±0,7	1,7±0,2	1,0±0,2	0,8±0,4	1,8±0,2	0,3±0,1					

(Continua)

Tabela 6: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros de morfologia espermática e do teste supra vital do sêmen fresco de cachacos que receberam níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L- glutamina e L- Ácido glutâmico na dieta.

(Continuação)

Linhagem	Cauda Dobrada Enrolada (%)							P-Valor		
	Trat % (C2)		Trat % (3)			T	L			
	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%	0,4651	0,0305	0,3869	
LA	4,1±0,5B	3,0±0,5	2,6±0,3B	3,2±0,4	3,3±0,7	2,2±0,3B				
LB	8,0±1,0A	4,3±0,5	7,2±1,0A	6,0±1,5	4,3±0,8	7,2±1,2A				
LC	5,1±1,0B	4,4±0,7	4,4±0,5B	4,6±0,7	4,7±0,5	4,2±0,6B				
LD	3,7±0,7B	3,8±0,3	3,9±0,3B	4,3±0,5	3,4±0,4	4,0±0,4B				
Cauda Dobrada Enrolada com Gota Citoplasmática Proximal (%)										
LA	0,3±0,1B	0,4±0,1B	1,0±0,0	0,4±0,1B	0,3±0,1	0,5±0,1	0,4241	0,0423	0,4140	
LB	0,8±0,1A	1,3±0,5A	0,6±0,4	1,3±0,6A	0,3±0,2	1,0±0,1				
LC	1,0±0,1A	0,2±0,1B	0,5±0,1	1,0±0,1A	0,4±0,1	0,6±0,2				
LD	1,2±0,1A	0,7±0,2B	0,7±0,1	2,0±0,8A	0,8±0,2	0,3±0,1				
Cauda Dobrada Enrolada com Gota Citoplasmática Distal (%)										
LA	1,0±0,3	0,4±0,1	0,3±0,1	1,0±0,3	0,3±0,1	0,8±0,2	0,1365	0,2392	0,0747	
LB	3,0±0,5	1,0±0,3	0,8±0,3	1,0±0,3	0,6±0,2	0,7±0,3				
LC	0,9±0,2	1,0±0,3	1,1±0,3	0,5±0,2	1,7±0,1	1,2±0,4				
LD	2,4±0,1	1,5±0,7	0,7±0,1	3,6±1,0	0,8±0,2	0,3±0,1				
Gota Citoplasmática Proximal (%)										
LA	2,6±0,4B	5,9±1,2B	7,8±0,9A	6,3±1,8B	7,2±1,0B	10,2±1,3A	0,9581	0,0424	0,0651	
LB	3,0±1,2B	5,4±1,3B	2,5±0,5B	6,5±1,0B	4,1±1,2B	2,6±0,3B				
LC	5,5±0,8B	4,9±0,4B	7,8±0,6A	4,0±0,5B	5,4±0,6B	7,9±1,1AB				
LD	15,0±2,1A	10,2±1,5A	6,7±0,4A	16,5±1,9A	12,1±1,5A	6,7±0,7A				
Gota Citoplasmática Distal (%)										
LA	5,7±0,4	6,3±0,7	4,4±0,6	5,8±0,9	6,1±1,6	5,5±0,7	0,510	0,735	0,424	
LB	11,6±5,2	4,7±0,5	3,8±0,1	7,5±1,3	3,7±0,7	5,2±1,2				
LC	5,2±0,5	5,7±0,6	9,2±1,8	5,2±0,5	6,8±1,2	9,8±2,7				
LD	11,7±1,6	4,4±0,4	5,1±0,4	14,7±3,0	7,0±0,6	4,8±0,6				

Tabela 6: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros de morfologia espermática e do teste supra vital do sêmen fresco de cachaaos que receberam níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L-glutamina e L- Ácido glutâmico na dieta.

Cabeça Isolada (%)											(Conclusão)
Linhagem	Trat % (C2)			Trat % (C3)			P-Valor				
	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%	T	L	C		
LA	0,6±0,1B	1,0±0,3B	1,0±0,4	0,7±0,3B	0,2±0,1B	0,7±0,2	0,109	0,001	0,1026		
LB	3,4±1,2A	2,2±0,8A	1,0±0,3	3,5±1,3A	2,6±0,6A	1,2±0,4					
LC	1,8±0,4B	1,0±0,4B	1,5±0,5	0,6±0,2B	0,9±0,2B	0,9±0,2					
LD	1,7±0,4B	1,1±0,2B	1,0±0,3	0,6±0,3B	0,9±0,2B	1,2±0,3					
Espermatozoides Vivos (%)											
LA	90,0±0,8	87,3±1,1	89,1±0,6	91,1±0,9	89,6±0,9	88,6±0,6	0,1045	0,0831	0,0831		
LB	87,2±2,1	88,8±0,8	88,7±0,7	87,2±1,1	88,9±1,4	89,7±1,0					
LC	86,4±1,2	85,9±0,8	87,1±0,8	85,9±0,2	86,4±0,8	89,1±0,5					
LD	83,0±2,1	86,3±1,2	90,0±0,3	84,5±1,4	88,3±0,6	91,0±0,6					
Espermatozoides Mortos (%)											
LA	9,4±0,8B	12,7±1,1	10,9±0,6	8,9±0,9B	10,4±0,B	11,4±0,6	0,0804	0,0336	0,5381		
LB	12,8±2,1B	11,2±0,8	11,3±0,7	12,8±1,1A	11,1±1,B	10,3±1,0					
LC	13,6±1,2B	14,1±0,	12,9±0,8	14,1±0,8A	18,8±4,A	10,9±0,5					
LD	17,0±2,1A	13,2±1,0	10,0±0,3	15,5±1,4A	11,7±0,B	9,4±0,6					

^{ab}Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na linha.

^{AB}Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na coluna.

Trat= Tratamento; C2= Ciclo2; C3= Ciclo3; Linhagens= LA, LB, LC e LD; T= Tratamento; L= Linhagem; T×L= Interação entre tratamento e Linhagem; C= Ciclo; T×C= Interação entre tratamento e Ciclo; L×C= Interação entre Linhagem e Ciclo.

Quando foram analisados os resultados dos parâmetros (Espermatozoides normais (%); Total de patologias (%); Defeito de cabeça (%); Defeito de peça intermediária (%); Cauda dobrada, enrolada com gota citoplasmática distal (%), Gota citoplasmática distal e Espermatozoides vivos (%)), pode-se constatar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos, linhagens e nos ciclos espermáticos avaliados.

Já para os parâmetros (Defeito de acrossoma (%); Cauda dobrada enrolada (%) e Cauda dobrada enrolada com gota citoplasmática proximal (%); Gota citoplasmática proximal (%) e espermatozoides mortos, os resultados obtidos nesta pesquisa, apontam diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens estudadas.

Numerosos estudos indicam que os resultados dos parâmetros quantitativos e qualitativos dos ejaculados são influenciados por fatores tanto dependentes, como independentes do suíno (Knecht *et al.*, 2017).

Dentre os fatores citados nos estudos, destacam-se: raça (KNECHT *et al.*, 2014), tamanho dos testículos (Clark *et al.*, 2003), estação (Corcuera *et al.*, 2002; Knecht *et al.*, 2014) e alimentação (Liu *et al.*, 2015), bem como idade e intervalos de coleta (Banaszewska e Kondracki, 2012). Os resultados deste trabalho estão em conformidade com os estudos, e outros citados anteriormente, de que a produtividade e qualidade espermática sofrem influência de vários fatores, e dentre eles, destaca-se, de acordo com os resultados obtidos, a genética.

Apesar dos resultados mostrarem que não houve efeito ($p > 0,05$) do tratamento nos parâmetros morfológicos avaliados, é importante destacar o quanto os referidos defeitos são prejudiciais para o processo de fertilização na suinocultura moderna.

No presente estudo, foram observadas maiores médias ($p < 0,05$) de defeito de acrossoma para as linhagens (C e D) no tratamento controle, enquanto que no tratamento com 0,5% de inclusão de L-Gln e L-Glu, as linhagens (A e B) obtiveram as maiores médias ($p < 0,05$) dessa patologia.

Na espermatogênese, na fase de diferenciação das espermátides arredondadas para as espermátides alongadas, é que ocorrem modificações nas estruturas, como a formação da cabeça com a vesícula acrossômica, mantendo um formato aerodinâmico para facilitar a chegada até o local de fertilização e qualquer defeito de má formação da cabeça, bem como, defeitos que possam prejudicar o acrossoma, pode inviabilizar a fertilização.

Com relação ao defeito de acrossoma, Johnson (2006) cita que as causas do defeito de acrossoma podem ser ambientais, genéticas ou uma combinação de ambas.

Um ponto a destacar é que a avaliação levou em consideração a duração de um ciclo espermatogênico (40 dias), tempo esse que foi considerado como o período que compreende a formação do espermatozoide na espécie suína.

Como afirmam Swierstra (1968), França e Cardoso (1998), em varrões, cada ciclo espermatogênico dura em média 8,6 – 9,0 dias, sendo que a duração total da espermatogênese é de aproximadamente 40 dias, ou seja, cerca de duas semanas para cada fase da espermatogênese.

Outro parâmetro que destaca-se aqui é a cauda, pois, é na cauda do espermatozoide, mais precisamente na peça intermediária, que estão alocadas as mitocôndrias, dessa forma, qualquer defeito nessa região pode comprometer a motilidade, bem como outros processos dependentes de energia.

Nerci *et al.* (2020) sugerem que os espermatozoides suínos, mesmo que comumente considerados exploradores preferencialmente da glicólise para obter energia, dependem fortemente do OXPHOS mitocondrial para a produção de ATP para alimentar a motilidade.

A motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides dependem da disponibilidade de ATP, a moeda energética da célula, que por sua vez depende do status mitocondrial (Piomboni *et al.*, 2012).

Na avaliação que capacita o sêmen suíno para processamento, de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de reprodução animal – CBRA (2013), o total de espermatozoides normais é de $\geq 70\%$.

Sendo assim, neste estudo, os resultados evidenciados com a utilização dos aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de machos suínos reprodutores, em estado ativo de reprodução, estão em conformidade com os padrões desejáveis recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se, neste estudo, que a inclusão de 0,5% e 1,0% de L- glutamina e L- ácido glutâmico na dieta de suínos machos reprodutores foi suficiente para proporcionar um efeito significativo ($p < 0,05$) entre o grupo de animais que receberam o suplemento e o grupo de animais controle, na avaliação de produtividade e qualidade espermática, demonstrando os efeitos metabólicos positivos do suplemento para esta categoria animal.

5 REFERÊNCIAS

AJINOMOTO DO BRASIL INDUSTRIA E COMERCIO DE ALIMENTOS Ltda. Disponível em: <https://assets.websitefiles.com/59f8dee3a38c420001ec96ab/60d263f23aa635420b04766f_pt-ft-AminoGut_Ficha%20Tecnica_Jun21.pdf> Acesso: agost. 24, 2024.

ALMEIDA, T. B. Boar welfare influence the quality of the gametes. 2021. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

BANASZEWSKA, D; KONDRACKI, S. An assessment of the breeding maturity of insemination boars based on ejaculate quality changes. **Folia Biologica (Kraków)**, v. 60, n. 3-4, p. 151-162, 2012.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J. et al. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1466-1479. E3, 2012.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

CLARK, S. G.; SCHAEFFER, D. J.; ALTHOUSE, G. C. B-mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm numbers. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1011-1023, 2003.

CORCUERA, B. D. et al. Relationship of environment temperature and boar facilities with seminal quality. **Livestock Production Science**, v. 74, n. 1, p. 55-62, 2002.

CRUZAT, V. F. et al. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 345-352, 2014.

CURI, R. et al. Regulatory principles in metabolism—then and now. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 13, p. 1845-1857, 2016.

ELOY, A.M.X. Estresse na produção animal. Embrapa (Comunicado técnico). P. 1676-7675, Sobral-CE, dezembro, 2007.

FRANÇA, L.R.; CARDOSO, F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. **Tissue Cell**, v. 30, n. 5, p. 573-582, 1998.

GONZÁLEZ-PEÑA, D. et al. Genetic gain and economic values of selection strategies including semen traits in three- and four-way crossbreeding systems for swine production. **Journal of animal science**, v. 93, n. 3, p. 879-891, 2015.

HAMED, M. A. et al. Glutamine restores testicular glutathione-dependent antioxidant defense and upregulates NO/cGMP signaling in sleep deprivation-induced reproductive dysfunction in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, p. 112765, 2022.

HODEL, C.; NATHUES, H.; GRAHOFER, A. Effect of housing conditions, management procedures and traits of the external male reproductive tract on the sexual behaviour of natural mating boars. **Theriogenology**, v. 167, p. 44-50, 2021.

JOHNSON, Cheri. Conceitos atuais sobre infertilidade no cão. **Waltham Focus**, v. 16, p. 7-12, 2006.

KAMANOVÁ V.; HADAŠ Z.; NEVRKLA P. Influence of genotype on production and quality of boar semen. Mendel University in Brno, Department of Animal Breeding, Czech Republic. Research in Pig Breeding, v.10, n2, p.14-17, 2016.

KAO, C. et al. Alterations in glutamine 60resente6060o and its conversion to citrulline in 60resen. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 12, p. E1359-E1364, 2013.

KNECHT, D.; JANKOWSKA-MAKOSA, A.; DUZIŃSKI, K. The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boars productivity. **Livestock Science**, v. 201, p. 13-21, 2017.

KNECHT, D.; ŚRODOŃ, S.; DUZIŃSKI, K. The influence of boar breed and season on semen parameters. **South African Journal of Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2014.

MESQUITA, A.A.; GALDEANO, J.V.B.; LEÃO, K.M.; MARTINS, P.C.; DA SILVA, F.G.S.; DA SILVA, M.A.P. Influência de diferentes sistemas de alojamento sobre a qualidade do sêmen de varrões. **PUBVET**, v. 5, p. 1-17, 2011.

MURGAS, L. D. S. **Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com rações suplementadas com óleos de soja como fonte de ácidos graxos**. Lavras, 1999. 111 f. Tese (Doutorado em Nutrição de Monogástricos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1999.

NESCI, S. et al. Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. **Theriogenology**, v. 144, p. 82-88, 2020.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and Glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 153-163, 2003.

OBERLENDER, G. et al. Influence of ejaculation time on sperm quality parameters in high performance boars. **Journal of Animal Science Advances**, v. 2, n. 5, p. 499-509, 2012.

OLIVEIRA, N. G. et al. Perfil Socioeconômico do Município de São Carlos/SC: uma contribuição para o Planejamento do Desenvolvimento Local, p. 7, 2019. Disponível em:<<https://aceleracaoregional.com.br/admin/administrativo/assets/documentos/8a26ebe15760ada0f986b7e8a9493e76sao-carlos.pdf>> Acessado: 23, agosto. 2024.

PIOMBONI P. et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility, vols. 109e24; 2012.

R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Viena: The R Foundation for Statistical Computing; 2011.

RODAS, P. C. et al. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. **Clinical 61resent**, v. 122, n. 12, p. 591-597, 2012.

ROSS, C. A. R. et al. **Manejo reprodutivo do macho suíno: sistemas de alojamento e de coleta de sêmen, uma revisão**. 2023. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

SALINAS, J. A. P. **Suplementação de glutamina: ácido glutâmico na dieta de varrões**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VIANA, C. H. C.; JORGE NETO, P. N.; MARQUES, M. G. Inseminação artificial em suínos no Brasil: biotecnologias e atualidades do mercado. 2020.

WABERSKI, Dagmar et al. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, v. 137, p. 2-7, 2019.

WANG, J. *et al.* Glutamine, glutamate, and aspartate differently modulate energy homeostasis of small intestine under normal or low energy status in piglets. **Animal Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 216-226, 2022.

WYSOKIŃSKA, A.; KONDRACKI, S. Assessment of sexual activity levels and their association with ejaculate parameters in two-breed hybrids and pure-bred Duroc and Pietrain boars. **Annals of Animal Science**, Siedlce, v. 14, n. 3, p. 559-571, 2014.

WU, G. *et al.* Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 2, p. R334-R342, 1995.

WU, G.; SELF, T.A. Amino acids: metabolism and functions. **Encyclopedia of Animal Science**, p.9-12, 2005.

WU, L. et al. Effects of dietary arginine and glutamine on alleviating the impairment induced by deoxynivalenol stress and immune relevant cytokines in growing pigs. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e69502, 2013.

ZHANG et al. mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 463, n. 1-2, p. 102-108, 2016.

CAPÍTULO II

DURABILIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN RESFRIADO E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN PÓS DESCONGELADO DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA

DURABILIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN RESFRIADO E QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN PÓS DESCONGELADO DE CACHAÇOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA

Resumo: O sêmen suíno conservado entre 15°C e 18°C é o meio mais eficiente para uso na reprodução de suínos em escala industrial, diferentemente do sêmen suíno criopreservado, que ainda enfrenta desafios para ser utilizado com a mesma eficiência na atualidade. Diferentes linhas de pesquisa buscam por elementos que possam proporcionar melhorias na qualidade das doses de sêmen resfriado, bem como do sêmen criopreservado. Os aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico têm despertado interesse para esse fim, visto que atuam de forma versátil no organismo. O presente estudo avaliou a durabilidade e a qualidade espermática do sêmen resfriado e a qualidade espermática do sêmen pós-descongelado de 24 cachacos com idade média de (21,5±4,40 meses), que receberam dietas com níveis crescentes de AminoGut (0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Gln e L-Glu). No decorrer de 120 dias de experimento, três coletas (C1= 40, C2= 80 e C3= 120 dias) da porção rica em espermatozoides dos ejaculados foram realizadas para avaliação de durabilidade e qualidade espermática do sêmen resfriado. Após cada coleta, a fração rica em espermatozoides dos ejaculados foi diluída (1:1; v/v) no diluidor de resfriamento (Duragem-Magapor), envasada em blister de 80 mL e encaminhada para análise quanto à motilidade total nos tempos (D1 = 24h e D5 = 120h) e avaliação dos parâmetros, lesão de acrossoma, lesão de membrana plasmática e estresse oxidativo do sêmen, nos tempos (D1 = 24h e D5 = 120h) em citometria de fluxo. Para avaliação do sêmen pós descongelado, 3 coletas foram realizadas (C1 = 92, C2 = 99 e C3 = 106 dias). Após cada coleta dos ejaculados, a fração rica em espermatozoides foi diluída (1:1; v/v) no diluidor de resfriamento (DR – 80% de solução de lactose a 11% e 20% de gema de ovo) para obter a concentração espermática necessária. Na diluição da fração rica dos ejaculados, o mesmo crioprotetor (89,5% de DR, 1,5% de Orvus Ex Paste e 9% de glicerol) foi adicionado em volume, até completar a quantidade necessária para o preenchimento das palhetas de 0,5 ml, as quais foram submetidas ao vapor de nitrogênio líquido (-90°C) por 20 minutos e, posteriormente, mantidas em nitrogênio líquido a -196°C. Para o descongelamento, a palheta contendo a amostra de sêmen foi retirada do botijão e colocada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. No pós-descongelamento, os parâmetros Motilidade total (MT); Motilidade progressiva (PM); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH); Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF); distância média do percurso (DAP); distância curvilínea (DCL); distância em linha reta (DSL); Linearidade (LIN); retidão (STR); velocidade média de percurso (VAP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade em linha reta (VSL), e oscilação (WOB) foram avaliados em sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), e os parâmetros Lesão de membrana plasmática (LMP); Lesão de acrossoma (LA); Integridade de cromatina (IC) e Estresse oxidativo do sêmen (EOS) por citometria de fluxo. No sêmen resfriado, houve diferença estatística ($p < 0,05$) considerando (D1 = 24h e D5 = 120h), independentemente do tratamento, para LA e LMP. Entre as coletas, independentemente do tratamento, houve diferença estatística ($p < 0,05$) para o EOS. Na avaliação do sêmen pós-descongelamento, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para os parâmetros cinéticos, assim como para (LA, LMP, EOS e IC). Conclui-se que os níveis de inclusão do suplemento utilizado não foram suficientes para promover efeitos significativos na avaliação do sêmen resfriado e do sêmen pós-descongelado. Esses resultados ressaltam a necessidade de continuidade das pesquisas na busca de melhores resultados para a durabilidade e qualidade do sêmen resfriado, bem como para a qualidade do sêmen pós-descongelado.

Palavras-chave: aminoácidos, nutrição, reprodução, reprodutor suíno.

DURABILITY AND SPERM QUALITY OF COOLED SEMEN AND SPERM QUALITY OF POST-THAWED SEMEN FROM BOARS SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT LEVELS OF L-GLUTAMINE AND L-GLUTAMIC ACID IN THE DIET

Abstract: Swine semen stored between 15°C and 18°C is the most efficient medium for use in industrial-scale pig reproduction, unlike cryopreserved porcine semen, which still faces challenges to be used with the same efficiency today. Different lines of research are seeking elements that can provide improvements in the quality of cooled semen doses, as well as cryopreserved semen. The amino acids L-glutamine and L-glutamic acid have garnered interest for this purpose, as they act in a versatile manner within the organism. The present study evaluated the durability and sperm quality of cooled semen and the sperm quality of post-thawed semen from 24 bulls with an average age of (21.5±4.40 months), who received diets with increasing levels of AminoGut (0.0%, 0.5%, and 1.0% of L-Gln and L-Glu). During the 120-day experiment, three collections (C1= 40, C2= 80, and C3= 120 days) of the sperm-rich portion of the ejaculates were carried out to evaluate the durability and quality of the cooled semen. After each collection, the sperm-rich fraction of the ejaculates was diluted (1:1; v/v) in the cooling dilutor (Duragem- Magapor), packaged in 80 mL blisters, and sent for analysis of total motility at times (D1 = 24h and D5 = 120h) and evaluation of parameters, acrosome damage, plasma membrane damage, and oxidative stress of the semen, at times (D1 = 24h and D5 = 120h) using flow cytometry. For the evaluation of post-thawed semen, 3 collections were performed (C1 = 92, C2 = 99, and C3 = 106 days). After each collection of the ejaculates, the sperm-rich fraction was diluted (1:1; v/v) in the cooling diluent (CD – 80% lactose solution at 11% and 20% egg yolk) to achieve the necessary sperm concentration. In the dilution of the rich fraction of the ejaculates, the same cryoprotectant (89.5% DR, 1.5% Orvus Ex Paste, and 9% glycerol) was added in volume until the necessary amount for filling the 0.5 ml straws was reached, which were then subjected to liquid nitrogen vapor (-90°C) for 20 minutes and subsequently maintained in liquid nitrogen at -196°C. For thawing, the straw containing the semen sample was removed from the canister and placed in a water bath at 37°C for 30 seconds. After thawing, the following parameters: Total Motility (TM); Progressive Motility (PM); Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH); Cross-Flagellar Beat Frequency (BCF); Average Path Velocity (APV); Curvilinear Path Velocity (VCL); Straight-Line Velocity (VSL); Linearity (LIN); Straightness (STR); Average Path Velocity (VAP); Curvilinear Path Velocity (VCL); Straight-Line Velocity (VSL), and Wobble (WOB) were evaluated using the CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) system, and the parameters Plasma Membrane Damage (PMD); Acrosome Damage (AD); Chromatin Integrity (CI) and Semen Oxidative Stress (SOS) by flow cytometry. In cooled semen, there was a statistical difference ($p < 0.05$) considering (D1 = 24h and D5 = 120h), regardless of the treatment, for LA and LMP. Between the collections, regardless of the treatment, there was a statistical difference ($p < 0.05$) for EOS. In the evaluation of post-thaw semen, there was no statistical difference ($p > 0.05$) for the kinetic parameters, as well as for (LA, LMP, EOS, and IC). It is concluded that the levels of inclusion of the supplement used were not sufficient to promote significant effects in the evaluation of cooled semen and post-thaw semen. These results highlight the need for continued research in the pursuit of better outcomes for the durability and quality of cooled semen, as well as for the quality of post-thawed semen.

Keywords: amino acids, nutrition, reproduction, swine breeder.

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro assume papel importante na geração de emprego e renda nas diferentes regiões do país, com atividades que colocam o Brasil entre os maiores produtores e exportadores do mundo, e dentre essas atividades, destaca-se a produção de suínos, que tem apresentado altos níveis de produção nos últimos anos.

O bom desempenho produtivo de suínos no Brasil tem sido atribuído, dentre outros, aos avanços na nutrição dos animais, na ambiência, no melhoramento genético e na utilização das biotecnologias de reprodução, com destaque para a inseminação artificial com sêmen diluído e resfriado entre 15°C a 18°C.

Waberski *et al.* (2019) afirmam que, no Brasil, a proporção de acasalamentos por I.A é de 95%, percentual semelhante ao de outros grandes produtores de suínos. A União Europeia, segundo maior produtor de suínos, possui o mesmo percentual do Brasil, que ocupa o quarto lugar.

Por outro lado, Jovicice *et al.* (2020) e Almubarak *et al.* (2021) afirmam que menos de 1% do sêmen criopreservado de suínos foi usado para inseminação artificial e fertilização in vitro.

A criopreservação espermática é uma das principais biotecnologias da reprodução, pois permite o armazenamento do sêmen por tempo indeterminado, o que facilita a difusão genética de reprodutores geneticamente superiores e torna possível o transporte seminal entre regiões geograficamente distantes (Veerkamp e Beerda, 2007; Andrade *et al.*, 2019; Yáñez-Ortiz *et al.*, 2022).

A produção e seleção de machos reprodutores visando o melhoramento genético, obteve um grande destaque a partir da utilização da inseminação artificial (IA) (Broekhuijse *et al.*, 2012). A atividade sexual, o volume e a qualidade do sêmen produzido por esses machos reprodutores tornaram-se características importantes para a IA (Wysokińska e Kondracki, 2014).

De acordo com Estiene *et al.* (2009), com o aumento de utilização da IA serão necessárias estratégias de manejo e nutrição para acrescentar fertilidade e qualidade ao sêmen.

Na nutrição do macho reprodutor suíno, o desafio atual é elaborar uma dieta que atenda às exigências nutricionais do animal e proporcionar o aumento da produtividade de sêmen juntamente com a melhoria da qualidade das células espermáticas.

Nesse contexto, inúmeras pesquisas no campo da reprodução de suínos têm investigado uma variedade de elementos ou compostos que possam possibilitar melhoras nas características

quantitativas e qualitativas das células espermáticas do sêmen diluído e conservado a temperatura entre 15°C a 18°C, bem como, melhorias nos parâmetros do sêmen criopreservado.

Dentre esses elementos, a incorporação de moléculas, como o colesterol e os aminoácidos, em protocolos de criopreservação do sêmen suíno pode aumentar a proteção da membrana espermática e a viabilidade dos espermatozoides nesses procedimentos (Salmon *et al.*, 2017).

Os aminoácidos L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico têm ganhado notoriedade no meio científico, pois participam de inúmeros processos metabólicos que são benéficos para o organismo como um todo.

A Glutamina é o aminoácido livre mais importante encontrado nos tecidos dos mamíferos, especialmente o muscular, desempenhando um importante papel na homeostase proteica (Watford e Wu, 2005).

De acordo com Newsholme (2003), ela age como precursora chave para a formação de nucleotídeos, e em muitas circunstâncias fisiológicas, a glutamina e o glutamato estão sensivelmente relacionados com a função de requerimento da célula.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a durabilidade e qualidade espermática do sêmen resfriado, bem como avaliar a qualidade espermática do sêmen pós-descongelado de cachacos suplementados com diferentes níveis de L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico na dieta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais, envolvendo os animais no estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE), Recife, sob o número de aprovação 1671090822.

2.1 Localização e estrutura da área experimental, animais e tratamentos

Este estudo foi conduzido em uma Unidade de Disseminação de Genética (UDG), pertencente à Empresa Bretanha Importação e Exportação Ltda, localizada na cidade de São Carlos, estado de Santa Catarina – SC.

O município possui clima mesotérmico e está a uma altitude média de 260 metros acima do nível do mar. Está localizado geograficamente na latitude de 27°05'00" ao Sul do Trópico de Capricórnio, e longitude de 53°01'00" ao Oeste do Meridiano de Greenwich (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Durante 120 dias, a pesquisa foi desenvolvida dentro de um galpão de alvenaria, coberto com telhas de fibrocimento, piso em concreto armado e com divisórias de gaiolas metálicas com dimensões (240cm x 70cm x 130cm), sendo estas equipadas com bebedouro do tipo nipple, comedouro do tipo calha e sistema de fornecimento de ração semiautomático para os animais.

Para a realização da coleta de sêmen, o referido galpão contava com uma sala de coleta com quatro divisórias em alvenaria (Box de coleta), piso cerâmico e equipada com 4 manequins fixos em aço inox. Tal estrutura tornava possível a realização do procedimento de coleta de sêmen de forma simultânea de quatro animais.

O galpão contava também com um laboratório para análise de sêmen, equipado com microscópio óptico e de contrastes, computador, estufa de circulação de ar forçada, envasadora, conservadora, refrigerador, osmose, balança de precisão e placa aquecedora.

Toda a estrutura do referido galpão contava com sistema automático de monitoramento de temperatura, umidade relativa do ar e ventilação.

Neste estudo, foram utilizados 24 suínos reprodutores machos saudáveis (*Sus scrofa domesticus*) com idade média de (21,5±4,40 meses), distribuídos individualmente em gaiolas metálicas em um delineamento de blocos casualizados (DBC), com 3 tratamentos (0,0 %; 0,5% e 1,0% de inclusão de L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico na dieta), 4 repetições (Blocos) com 2 animais cada repetição.

No período experimental (120 dias), os animais foram alimentados com ração padrão da central (RPC) à base de milho e farelo de soja (Tabela 1), fornecida pela Empresa Polinutri Alimentos S/A, CNPJ: 60.210.515/0004-90, sendo fornecida diariamente às 6:00 h da manhã na quantidade de 2,5 kg em um único trato e o suplemento L – Glutamina e L – Ácido Glutâmico (AminoGut) (Tabela 2), fornecido pela empresa Ajinomoto do Brasil Industria e Comercio de Alimentos Ltda., CNPJ: 46.344.354/0001-54, foi incluso na ração de forma *on top* de acordo com cada tratamento e o acesso a água pelos animais foi *ad libitum*.

Tabela 1: Composição nutricional Básica das dietas fornecidas para Suínos machos Reprodutores durante o período experimentais.

(Continua)

Ingredientes	Dietas Experimentais		
	(RPC) + 0% L- Gln e L- Glu	(RPC) + 0,5% L- Gln e L- Glu	(RPC) + 1,0% L- Gln e L- Glu
Umidade (max)	125g/kg	125g/kg	125g/kg
Proteína Bruta (min)	140g/kg	140g/kg	140g/kg
Extrato Etéreo (min)	30g/kg	30g/kg	30g/kg
Fibra Bruta (max)	75g/kg	75g/kg	75g/kg
Matéria mineral (max)	85g/kg	85g/kg	85g/kg
Cálcio (min)	7.500mg/kg	7.500mg/kg	7.500mg/kg
Cálcio (max)	12g/kg	12g/kg	12g/kg

Tabela 1: Composição nutricional Básica das dietas fornecidas para Suínos machos Reprodutores durante o período experimentais.

Ingredientes	(Conclusão)		
	Dietas Experimentais		
	(RPC) + 0% L- Gln e L- Glu	(RPC) + 0,5% L- Gln e L- Glu	(RPC) + 1,0% L- Gln e L- Glu
Fósforo (min)	6500mg/kg	6500mg/kg	6500mg/kg
Lisina (min)	6.500mg/kg	6.500mg/kg	6.500mg/kg
Carnitina (min)	50mg/kg	50mg/kg	50mg/kg
Metionina (min)	2400mg/kg	2400mg/kg	2400mg/kg
Sódio (min)	2.300mg/kg	2.300mg/kg	2.300mg/kg
Ferro (min)	70mg/kg	70mg/kg	70mg/kg
Cobre (min)	66mg/kg	66mg/kg	66mg/kg
Manganês (min)	29mg/kg	29mg/kg	29mg/kg
Zinco (min)	157mg/kg	157mg/kg	157mg/kg
Iodo (min)	1,1mg/kg	1,1mg/kg	1,1mg/kg
Selênio (min)	0,35mg/kg	0,35mg/kg	0,35mg/kg
Cromo (min)	2mg/kg	2mg/kg	2mg/kg
Vitamina A (min)	8.500UI/kg	8.500UI/kg	8.500UI/kg
Vitamina D3(min)	1700UI/kg	1700UI/kg	1700UI/kg
Vitamina E(min)	85UI/kg	85UI/kg	85UI/kg
Vitamina K3 (min)	2,1mg/kg	2,1mg/kg	2,1mg/kg
Vitamina B1(min)	3,6mg/kg	3,6mg/kg	3,6mg/kg
Vitamina B2(min)	8,0mg/kg	8,0mg/kg	8,0mg/kg
Vitamina B6(min)	5,6mg/kg	5,6mg/kg	5,6mg/kg
Vitamina B12(min)	37,5mg/kg	37,5mg/kg	37,5mg/kg
Niacina (min)	44,5mg/kg	44,5mg/kg	44,5mg/kg
Pantotenato de Cálcio (min)	28,24mg/kg	28,24mg/kg	28,24mg/kg
Ácido Fólico (min)	2,72mg/kg	2,72mg/kg	2,72mg/kg
Biotina (min)	0,68mg/kg	0,68mg/kg	0,68mg/kg
Cloreto de Colina (min)	1.400mg/kg	1.400mg/kg	1.400mg/kg
Vitamina C (min)	500mg/kg	500mg/kg	500mg/kg

Fonte: Adaptado da tabela fornecida pela Polinutri Alimentos S/A (2022).

Tabela 2: Ficha Técnica AminoGut (L- Glutamina e L- Ácido Glutâmico)

Indicação	
Aminoácido para todas as espécies animais.	
Características Física	
Pó cristalino de coloração branca a amarelo claro	
Gravidade específica, kg/L 1,5 a 1,6	
Garantia Comercial	
L- Glutamina, % 10,0 Mínimo	
L-Ácido Glutâmico, % 10,0 Mínimo	
Valores Nutricionais	
Matéria seca, % 99,0 Mínimo	
Proteína bruta, % 60,0 Mínimo N x 6,25 (por convenção)	
EB, kcal/kg 3646	
ED, kcal/kg (suínos) 3617	
EM, kcal/kg (suínos) 3434	
EL, kcal/ kg (suínos) 2661	
Registro	
Produto isento de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil	
Adaptado: Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda (2021).	

2.2 Coleta e avaliação do sêmen para processamento

Durante o período experimental (120 dias), a porção rica em espermatozoides dos ejaculados de 24 suínos machos reprodutores, com idade média de $(21,5 \pm 4,40)$ meses, foi coletada 2 vezes por semana.

Os ejaculados foram coletados pelo método semiautomático, em manequim fixo, em sala apropriada, com uso de copo térmico contendo filtro de papel para separar a fração gelatinosa e saco plástico para contenção da fração rica do sêmen, que eram imediatamente encaminhados para o laboratório para avaliação.

Ao entrar no laboratório, a fração rica dos ejaculados era pesada em balança de precisão e o resultado expresso em mililitros (mL) de acordo com (CBRA,2013).

Em seguida, os parâmetros de motilidade massal, volume, patologia, concentração, bilhões de espermatozoides por coleta, espermatozoides viáveis por dose e número de doses eram avaliados em sistema CASA (Sistema de Análise Computadorizada de sêmen – Magavision, Magapor).

2.3 Diluição e coleta de amostras do sêmen resfriado

Para a avaliação do sêmen resfriado, a cada 40 dias ($C1= 40$, $C2= 80$ e $C3= 120$), após a realização da coleta, a fração rica em espermatozoides dos ejaculados foi diluída (1:1; v/v) no diluidor de resfriamento (Duragem - Magapor) e envasada em blister de 80 mL e encaminhada para avaliação de Motilidade total nos tempos ($D1= 24h$ e $D5=120h$) e qualidade espermática (Lesão de acrossoma, Lesão de membrana e Estresse oxidativo) realizada em citometria de fluxo.

O procedimento se deu da seguinte forma: Foi realizada a pesagem da quantidade do volume do diluente (Duragem- Magapor) em jarra de material plástico apropriado, contendo saco plástico. Tais quantidades eram seguidas fielmente de acordo as informações repassadas pelo sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis).

Na sequência, o sêmen foi adicionado à quantidade de diluente pré-determinada pelo sistema CASA, sendo os mesmos misturados de forma manual por movimentos leves do recipiente para possibilitar a total mistura do diluente com o sêmen.

Em seguida, com auxílio de uma pipeta, uma gota da mistura (sêmen/diluente) foi retirada e colocada em lâmina pré-aquecida ($37^{\circ}C$) com lamínula sobre a gota para verificação da motilidade dos espermatozoides em microscópio óptico em lente de aumento de 10x.

Realizados esses procedimentos, o sêmen diluído seguia para a etapa de envase. O envasamento do sêmen foi feito em uma envasadora semiautomática, sendo que a máquina era

programada para envasar o volume de acordo com a necessidade da produção de determinada dose, normal (Blister de 80mL) ou dose pós-cervical (Blister de 45mL). Para a avaliação de durabilidade e qualidade espermática do sêmen resfriado, o procedimento acima citado foi realizado 3 vezes no decorrer dos 120 dias de experimento. A primeira coleta ocorreu após 40 dias (C1), a segunda coleta foi realizada no dia 80 (C2) e a terceira coleta ocorreu no dia 120 (C3). Em cada coleta foram retiradas 2 amostras de 80 mL de sêmen processado de cada animal do experimento, para posterior análise de durabilidade e qualidade espermática em citometria de fluxo.

2.4 Análise de durabilidade, Lesão de membrana, Lesão de acrossoma e estresse oxidativo do sêmen resfriado entre 15°C e 18°C

Para a durabilidade (D1= 24h e D5= 120h) das doses inseminantes, foram avaliados os parâmetros de Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado.

Um total de 128 amostras de sêmen foram processadas e utilizadas para análise em citometria de fluxo.

Foi utilizado um Citômetro de fluxo BD AccuriTMC6 (BD AccuriTMC6, EUA), que contém um feixe de laser de 488nm como fonte de excitação, o mesmo possui detectores que permitem avaliar células pelo tamanho (FSC) e por sua complexidade (SSCA), também é equipado com filtros de fluorescência capazes de captar diferentes comprimentos de luz 533/30 (FL-1), 585/40 (FL-2) e 675/25 (FL-3).

No equipamento, ao passar pelo laser, as células emitem sinal luminoso, que por sua vez é captado pelos filtros de luz do aparelho e convertido em gráficos de pontos pelo software BD CSampler Software. Através dos gráficos gerados, é então realizada a análise com aplicação de GATES.

2.5 Determinação da População alvo (Amostra Branco), Avaliação de Integridade de Acrossoma, Integridade de membrana e Avaliação do Estresse Oxidativo do Sêmen

Para a determinação da população alvo (células espermáticas a serem avaliadas), é realizada a passagem de amostras Branco, ou seja, sem incorporação de sonda fluorescente no sêmen. A referida amostra é utilizada para determinação da população alvo, que em seguida é avaliada com GATES. Tal procedimento, possibilita a remoção de sujidades da amostra,

mantendo assim, apenas as células espermáticas na leitura.

Após a determinação da população alvo, foi realizada a passagem de amostras com sondas. Cada sonda incorporada a amostra de sêmen ao ser excitada pelo laser do aparelho emite um comprimento de fluorescência específico, os filtros de luz captam essas variações e traduzem a informação em gráficos de pontos. Utilizando do gate aplicado na amostra branco e excluindo as leituras fora do gate (detritos ou sujidades) é então definido as retas do eixo X e Y.

Para realização da análise dos dados gerados pela leitura é necessário primeiramente definir o padrão de agrupação celular normal, isto é, realizar uma leitura de uma amostra Branca sem a adição de sonda, após o resultado é aplicado o “gate” para definir a população de espermatozoides e excluir quaisquer leituras de demais células ou organismos presentes na amostra. Em um segundo gráfico é então aplicado o gate para seleção das células não marcadas e aplicação de retas nos eixos X e Y para delimitar os quadrantes do gráfico. As células localizadas no quadrante inferior esquerdo representam o grupo não marcado, as localizadas no quadrante superior ou inferior direito são células que foram marcadas pelas sondas utilizadas.

As avaliações foram realizadas no tempo de 24:00h (D1) após o envase e 120:00h (D5) após envase da dose inseminante.

Na avaliação da integridade do acrossoma foi utilizada a sonda *Pisum aglutinina sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis Missouri, EUA; 1,25 µg/mL; BP: 530/30 nm). Como descrito anteriormente, primeiro foi realizada uma leitura da amostra branco (sem incorporação de sonda fluorescente no sêmen). Após a definição do gate excluindo todos os detritos, foi feita a leitura da amostra de sêmen com a sonda (FITC).

Nessa avaliação, foram utilizados 50µl de sêmen com 0,75µl de sonda (1,25µg/mL) e incubados por 10 min a 37°C em seguida adicionou-se 50µl de diluente de sêmen e se realizou a leitura por citometria. Apenas as células lesionadas foram marcadas pela sonda FITC pois o acrossoma íntegro é impermeável.

Para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides nos tempos 24h (D1) e 120h (D5) após envase da dose inseminante, foi utilizada o iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis Missouri, EUA; 10µg / mL; BP: 610/20 nm). O Iodeto de propídio é uma substância fluorescente que quando excitada por laser emite ondas de luz de 617nm.

A referida sonda se liga aos ácidos nucleicos do espermatozoide quando a célula apresenta membrana citoplasmática lesionada, não ocorrendo o ligamento com membranas

íntegras, visto que a membrana plasmática é impermeável ao PI.

Assim como na avaliação de lesão de acrossoma, primeiramente é feita a passagem de uma amostra (Branco) para definição da população-alvo, somente depois é feita a leitura da amostra com a sonda (PI).

Para o preparo das amostras com o iodeto de propídio foram utilizados 50µl de sêmen e foram adicionados 0,75µl de sonda PI (10µg/mL) e incubadas por 10 min a 37°C, após o tempo de incubação adicionou-se à amostra mais 50µl de diluente de sêmen e então realizado a leitura.

Para a avaliação do estresse oxidativo do sêmen suíno, a detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada usando a 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCF) por citômetro de fluxo.

Para o preparo das amostras com o diacetato de diclorofluoresceína (DCF) foram utilizados 50µl de sêmen e adicionados 1,0µl de sonda (DCF), sendo que, nessa solução foi também adicionada a sonda PI (10µg/mL) e incubada por 10 min a 37°C. Após o tempo de incubação, foi então adicionado à amostra mais 50µl de diluente de sêmen e, então, realizada a leitura.

2.6 Diluição e coleta de amostras do sêmen para congelamento

Ejaculados provenientes de 24 cachacos foram coletados em 3 coletas (C1=92, C2=99 e C3=106 dias) e diluídos em diluidor comercial (Duragem- Magapor) e refrigerados a 17°C por 20 horas na proporção de 1 parte de sêmen para duas partes de diluidor. As doses foram centrifugadas (1600g por 5 minutos a 15°C) para a retirada do sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso de acordo com a concentração e número de palhetas a serem produzidas, em diluidor de resfriamento (DR - 80% de solução de lactose 11% e 20% de gema de ovo) até que se atingisse o volume de preenchimento do número de palhetas total dividido por dois. Em seguida, os ejaculados foram resfriados a 5°C durante 90 min e então adicionado o diluidor de congelamento (89,5% de DR, 1,5% de Orvus Ex Paste e 9% de glicerol) em volume a completar a quantidade necessária para o preenchimento das palhetas. O envase foi feito em palhetas de 0,5 ml, as quais foram submetidas ao vapor de nitrogênio líquido (-90°C) por 20 minutos e, posteriormente, mantidas em nitrogênio líquido a -196°C. Para o descongelamento, a palheta contendo a amostra de sêmen era retirada de dentro do botijão e colocada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Em seguida, a palheta era removida da água, seca com papel toalha e realizada a transferência do sêmen descongelado para um microtubo. Para análise, retirou-se uma alíquota, que foi diluída em proporção 1:20 em diluente comercial aquecido a 38°C e após 10 minutos, a amostra de sêmen previamente diluída foi avaliada em sistema um sistema CASA

(Computer-Assisted Semen Analysis) quando a motilidade espermática e parâmetros cinéticos (MT = Motilidade total (%); PM = Motilidade progressiva (%); ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF = Frequência de batimento flagelar cruzado (Hertz); DAP = distância média do percurso (μm); DCL = distância curvilínea (μm); DSL = distância em linha reta (μm); LIN= Linearidade (%); STR = retidão (VSL/VAP); VAP = velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$); VCL = velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL = velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$); WOB = oscilação (VAP/VCL). e em citometria de fluxo foram avaliados os parâmetros (Lesão de acrossoma (LA), Lesão de membrana plasmática (LMP), Estresse oxidativo do sêmen (EOS) e Integridade de cromatina (IC)).

2.7 Análises Estatísticas

Para testar a normalidade de todos os dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk e foi realizado o teste de One-way analysis of variance (ANOVA) para medidas repetidas para verificação do efeito.

Para avaliação dos parâmetros do sêmen resfriado, primeiramente foi realizado o teste de medidas repetidas considerando separadamente o tempo de armazenamento (D1 e D5) e dia da Coleta (C1, C2 e C3) como as repetições e testando o efeito do tratamento.

Para a avaliação dos sêmen pós-descongelado também foi realizado a (ANOVA), para medidas repetidas no tempo.

Todos os dados foram submetidos ao programa estatístico R, com os pacotes ggplot2, ggpubr e dplyr (RDevelopment Core Team, 2011). O nível de significância adotado nas análises foi de $P < 0.05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na (Tabela 3) estão os resultados referentes às análises realizadas ao final de cada ciclo espermático (C1= 40º dia; C2= 80º dia e C3= 120º dia) para os parâmetros Motilidade total, Lesão do Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse oxidativo do sêmen resfriado de suínos machos reprodutores que receberam dietas contendo níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L-Glutamina e L-ácido glutâmico.

De acordo com os resultados (Tabela 3), não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos nos ciclos (C1= 40º dia; C2= 80º dia e C3= 120º dia) para os parâmetros Motilidade total ($P = 0,854$), Lesão de Acrossoma ($P = 0,638$), Lesão de Membrana Plasmática

($P = 0,474$) e estresse oxidativo do sêmen ($P = 0,5296$), ou seja, o tratamento não interferiu nos referidos parâmetros ao longo do período do estudo.

Os valores dos percentuais médios obtidos nesse estudo para Motilidade total, variaram entre (84 ± 11 e $89 \pm 8,4$), já para os parâmetros (LA e LMP) variaram entre 14,4% a 19,6% no primeiro ciclo (40 dias), com aumento numérico dos valores para as lesões nas demais avaliações (C2 e C3) sem haver diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos nos ciclos.

Os resultados acima citados para os parâmetros (LA e LMP) se assemelham com os encontrados por Menegat (2016) quando avaliou a qualidade espermática do sêmen diluído em uma mistura de extensores de curto e longo prazo, sendo que as médias de integridade da membrana e do acrossoma não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela homogeneização da dose de sêmen ($85,1 \pm 1,8\%$ vs. $83,9 \pm 1,9\%$). No entanto, os resultados de motilidade total encontrados neste estudo são numericamente maiores do que os encontrados pelo autor em sua pesquisa.

Rech (2020), trabalhando com a adição de ácido clorogênico ao diluente de sêmen suíno, obteve percentual médio de lesão de membrana de ($15,53 \pm 1,13\%$), esses resultados são próximos aos valores encontrados nesse trabalho, que avaliou a qualidade espermática utilizando os aminoácidos L-Gln e L-Glu na dieta de cachorros.

Tabela 3: Média e erro padrão da média (EPM) dos tratamentos nos ciclos (C1; C2 e C3) para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0% de L- Glutamina e L-ácido glutâmico).

Variável	Dia da coleta									P<0,05
	C1= 40º dia			C2= 80º dia			C3= 120º dia			
	TRATAMENTOS			TRATAMENTOS			TRATAMENTOS			
	0%	0,5%	1%	0%	0,5%	1,0%	0%	0,5%	1%	
MT(%)	84±11,6	87±8,3	86±9,2	85±8,2	86±9,4	88±8,2	89±8,4	84±5,4	89±5,5	0,854
LA(%)	16,3±2,6	19,6±2,3	18,3±2,3	21,4±4,0	18,1±4,0	21,5±4,3	14,1±2,7	14,7±2,4	19,2±3,2	0,638
LMP(%)	14,4±4,3	17,6±3,5	14,5±2,7	26,1±1,8	21,1±2,3	21,2±2,4	29,8±4,7	25,1±5,1	27,0±3,3	0,474
EOS (%)	9,4±	22,0±	28,5±	61,7±4,5	56,7±4,2	52,5±4,4	62,9±4,4	56,5±4,4	59,0±3,1	0,529

^{ab}Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05). C1= Ciclo 1; C2= Ciclo 2; C3= Ciclo 3; MT= Motilidade total; LA= Lesão de Acrossoma; LMP= Lesão de Membrana Plasmática e EOS= Estresse Oxidativo do Sêmen.

Na (Tabela 4) estão contidos os resultados da avaliação entre as coletas independentes dos tratamentos para os parâmetros: Motilidade total (MT), Lesão do Acrossoma (LA), Lesão de Membrana Plasmática (LMP) e Estresse Oxidativo do Sêmen (EOS) do sêmen de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L- Glutamina e L- ácido glutâmico.

Tabela 4: Média e erro padrão da média (EPM) das coletas (C1; C2 e C3) independente do tratamento para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen, de cachacos que receberam dietas contendo níveis de (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L- Gln e L- Glu.

Variável	Dia da coleta			P<0,05
	C1= 40º dia	C2= 80º dia	C3= 120º dia	
	Trat%(0,0; 0,5 e 1,0)	Trat%(0,0; 0,5 e 1,0)	Trat%(0,0; 0,5 e 1,0)	
MT(%)	86±9,3	87±12,3	88±12,3	0,5651
LA (%)	18,43±1,4	20,34±2,4	16,40±1,7	0,3845
LMP (%)	15,75±1,9b	22,63±1,3a	27,35±2,4a	0,00002
EOS (%)	22,67±3,1b	56,58±2,5a	59,54±2,2a	0,001

^{ab}Letras diferentes na linha indicam diferença estatística (p<0,05). C1= Coleta 1; C2= Coleta 2; C3= Coleta 3; Trat= Tratamentos; MT= Motilidade total; LA= Lesão de Acrossoma; LMP= Lesão de Membrana Plasmática; EOS= Estresse Oxidativo do Sêmen.

Os resultados contidos na (Tabela 4) mostram que não foi constatada diferença estatística ($p > 0,05$) para os parâmetros motilidade total, com percentual médio variando entre (86±9,3 e 88±12,3) e lesão de acrossoma, variando entre (16,40±1,7 e 20,34±2,4), na avaliação entre as coletas independente dos tratamentos.

Quando foi avaliado o parâmetro Lesão de Membrana Plasmática, foi constatada diferença estatísticas ($P = 0,00002$) entre as médias das coletas independente dos tratamentos, sendo que, o percentual médio na coleta 1 (C1) foi de 15,75±1,9. Esse resultado demonstrou que ocorreu menos lesão de membrana plasmática na coleta 1 (C1), quando comparado com a coleta (2 e 3).

Esses resultados apresentados demonstram um aumento da lesão de membrana plasmática entre as coletas ao longo do tempo, sugerindo que tal fato possa ser consequência dos fatores estressantes vivenciados pelos animais na rotina da central, bem como do processo de produção das doses inseminantes, que somados, impõem desafios para a célula espermática manter sua integridade estrutural e funcional.

O estresse oxidativo é apontado como importante causador de danos estruturais e funcionais na célula espermática, devido à composição lipídica da membrana plasmática, bem como, da baixa capacidade de defesa antioxidante do espermatozoide.

Nesse estudo, utilizou-se L-Gln e L-Glu na busca de melhores resultados na durabilidade e qualidade espermática do sêmen resfriado em temperaturas entre 15° e 18°C, e os resultados aqui obtidos para a lesão de membrana plasmática são promissores frente a outras pesquisas que também avaliaram esse parâmetro.

Labêta (2017) trabalhando com vitamina E e diferentes temperaturas na viabilidade do sêmen suíno, não constatou diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos utilizados, com obtenção de porcentagens médias para integridade de membrana que variaram de ($28,33 \pm 5,78$ a $71,67 \pm 1,40$), esses resultados estão acima do percentual médio encontrado nesse estudo com L-gln e L-glu que ficaram entre ($15,75 \pm 1,9$ a $27,35 \pm 2$).

No estudo de Hallberg *et al.* (2024) avaliando a qualidade e fertilidade espermática *in vitro* em temperatura de 4°C e em temperatura convencional (15°C a 18°C) por uma semana, constatou-se valores médios de Integridade da membrana plasmática de ($91 \pm 0,05$) quando conservado a 16°C por seis dias. Esse resultado reflete excelente condição de conservação para integridade de membrana, visto que longos períodos de conservação, espera-se maiores valores dessa lesão.

No presente estudo, os valores de lesão de membrana conservados a temperaturas entre 15°C e 18°C foram maiores ($15,75 \pm 1,9$ a $27,35 \pm 2$) em comparação aos do estudo acima citado.

A provável explicação para os menores valores encontrados para lesão de membranas no estudo anteriormente citado seja em função do extensor (AndroStar® Premium) utilizado na pesquisa. É citado que, de acordo com o fabricante, o extensor contém estabilizadores de membrana e inibidores de capacitação, que ajudam a manter a qualidade do espermatozoide a longo prazo (Wiebke *et al.*, 2022).

No mesmo estudo, a informação é corroborada com Waberski *et al.* (2022) de que, a viabilidade do espermatozoide de suínos foi mantida no AndroStar® Premium em baixas temperaturas, ao contrário da solução Beltsville-awing.

No presente estudo, o extensor utilizado foi o (Duragem, Magapor®), que também contém estabilizadores de membrana e inibidores de capacitação. Sua fórmula é uma combinação de antioxidantes e protetores de membrana.

Na avaliação do estresse oxidativo do sêmen, os resultados da (Tabela 4) apontam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando avaliadas as coletas independentemente dos tratamentos, sendo que os valores da porcentagem média foram de $22,67 \pm 3,1$ na (C1), de $56,58 \pm 2,5$ na (C2) e $59,54 \pm 2,2$ na (C3), mostrando que o valor apresentado na (C1) é significativamente ($P = < 0,001$) menor quando comparado aos valores da (C2 e C3).

Em comparação com outras espécies de animais domésticos, o sistema de defesa antioxidante enzimático do sêmen suíno apresenta uma menor eficiência. Isto ocorre devido à menor presença de enzimas como a GR, GPx e CAT, que o tornam mais suscetível aos danos exercidos pelas EROs (Strzezek; Lapkiewicz; Lecewicz, 1999).

É citado por Aitken et al. (2016); Halliwell e Gutteridge (2015) que, o estresse oxidativo instala-se quando a produção de ROS suplanta a capacidade natural (endógena) antioxidante da própria célula ou tecido, caracterizando assim um desequilíbrio redox.

É sugerido, com esses resultados, que o aumento dos valores de estresse oxidativo do sêmen ao longo do tempo, está diretamente ligado ao aumento dos valores de lesão da membrana plasmática, discutido anteriormente neste estudo.

Nas análises realizadas por citometria de fluxo para os parâmetros Motilidade total (MT), Lesão de Acrossoma (LA), Lesão de Membrana Plasmática (LMP) e Estresse Oxidativo do Sêmen (EOS), considerando separadamente o tempo de armazenamento (D1 = 24h e D5 = 120h) foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 5).

Tabela 5: Média e erro padrão da média (EPM) dos tratamentos nos tempos de armazenamento (D1= 24h e D5= 120h) para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado de cachaços que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) dos aminoácidos L- Glutamina e L- ácido glutâmico.

Variável	Tempo de armazenamento						P<0,05
	D1=24:00h			D5=120:00h			
	Tratamentos			Tratamentos			
	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,5%	1,0%	
MT	88±11,6	90±8,9	86±9,2	70±10,4	77±6,3	70±6,2	0,278
LA (%)	11,94±2,2	11,05±1,3	11,74±1,2	22,31±2,7	23,09±2,8	27,04±2,8	0,504
LMP (%)	23,52±3,5	16,31±2,4	16,33±1,5	27,05±3,2	25,97±3,2	25,56±2,9	0,199
EOS (%)	51,66±7,3	38,74±5,7	46,46±4,7	51,85±6,1	50,03±4,4	47,73±4,1	0,339

^{ab}Letras diferentes na linha indicam diferença estatística (p<0,05) considerando separadamente o tempo de armazenamento. D1= 24h de armazenamento; D5= 120h de armazenamento; MT= Motilidade total; LA= Lesão de Acrossoma; LMP= Lesão de Membrana Plasmática e EOS= Estresse oxidativo do sêmen.

Os resultados para o parâmetro Motilidade total (Tabela 5) considerando separadamente o tempo de armazenamento (D1= 24h e D5= 120h), mostram que, apesar de ter ocorrido uma redução nos valores médios de motilidade total no (D5= 120:00h), não foi constatada diferença estatística significativa (p>0,05), entre os grupos tratados e o grupo controle nas avaliações, ou seja, o tratamento não interferiu na avaliação ao longo do período de armazenamento.

Toniolli *et al.* (2023), em sua pesquisa utilizando diferentes concentrações antibióticas adicionadas ao diluente de sêmen suíno, no quarto dia (D4) de armazenamento, obteve valores médios de motilidade entre 22,8% e 41,4%. Tais valores foram considerados baixos para motilidade.

Abreu *et al.* (2021) afirmam que, além de gerar resistência bacteriana, o uso de antibióticos tem sido associado ao efeito tóxico, sendo que o mecanismo celular responsável por esse efeito ainda não é totalmente conhecido, no entanto, pode afetar a funcionalidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

No presente estudo com uso de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de cachaços, os valores médios para motilidade são maiores do que os encontrados no trabalho citado anteriormente, sendo que, em média, os resultados foram de $(70 \pm 10,4$ e $77 \pm 6,3\%)$ e esses valores referem-se ao (D5=120h) de armazenamento. Nesse sentido, pode-se sugerir que o suplemento não ocasionou qualquer efeito negativo que pudesse comprometer a qualidade das doses inseminantes no período de armazenamento.

O percentual médio de lesão de acrossoma variou de $11,05 \pm 1,3$ a $11,94 \pm 2,2$ no (D1= 24:00h de armazenamento) e, no (D5= 120:00h de armazenamento), após a coleta, o percentual médio ficou entre $22,31 \pm 2,7$ e $27,04 \pm 2,8$, não sendo constatada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores quando considerado separadamente o tempo de armazenamento. (D1= 24h) de armazenamento; (D5= 120h) de armazenamento.

Quando foi avaliado o parâmetro lesão de membrana plasmática, os resultados mostraram que não foi verificado efeito do tratamento ($p > 0,05$), quando comparados os dois tempos de armazenamento (D1= 24h e D5= 120h). Nesse caso também, o tratamento não interferiu ($P = 0,199$) nesse parâmetro durante os tempos de avaliação e os percentuais variaram de $16,31 \pm 2,4$ a $23,52 \pm 3,5$ no período de armazenamento de 24:00h e de $25,56 \pm 2,9$ a $27,05 \pm 3,2$ após 120h de armazenamento.

Para o parâmetro estresse oxidativo do sêmen (EOS), os resultados foram semelhantes aos demais discutidos anteriormente (Tabela 5), quando considerado separadamente o tempo de armazenamento (D1= 24h e D5= 120h), não foi verificado efeito do tratamento ($p > 0,05$) nos dois tempos de armazenamento (D1= 24h e D5= 120h), ou seja, o tratamento não interferiu ($P = 0,339$) na avaliação do referido parâmetro nos tempos de armazenamento.

Apesar do constante aprimoramento de diluidores comerciais em busca de melhor manutenção da viabilidade espermática por maiores períodos de estocagem, uma considerável perda do potencial fertilizante dessas células pode ser observada dentro dos três primeiros dias de armazenamento (Waberski; Henning; Petrunina, 2011).

No presente estudo, os percentuais médios de (LA e LMP) aumentaram entre os tempos de avaliação (D1= 24h e D5= 120h), como será mostrado e discutido em outro momento nesse trabalho.

Kumaresan *et al.* (2009) afirmam que outro importante desafio encontrado pela célula espermática durante seu armazenamento inclui o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aliado à perda da capacidade de neutralizá-las pelos antioxidantes presentes no meio.

Apesar da não constatação de diferença estatística ($p > 0,05$) dos tratamentos nos tempos de armazenamento (D1 e D5), os valores dos percentuais médios registrados para esse parâmetro evidenciam a necessidade de se buscar meios para a redução dos danos ocasionados pelo estresse oxidativo do sêmen ao longo do período de armazenamento, para se ter doses com melhor potencial de fertilização.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes intrínsecas do sistema biológico, resultando em danos celulares e, por fim, morte celular (Galić *et al.*, 2022).

No entanto, estas moléculas, em muitos casos, também atuam em condições fisiológicas, participando de processos bioquímicos como sinalizadores celulares (Davydov *et al.*, 2018).

A afirmação acima é corroborada por Santos (2022), apesar de as EROs estarem diretamente relacionadas com o estresse oxidativo e danos celulares, elas possuem funções orgânicas importantes para a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides, estando envolvidas no transporte de elétrons da cadeia respiratória, no processo de hiperativação da cauda, capacitação e reação do acrossoma e nos mecanismos de fixação ao oócito.

Na (Tabela 6) estão os resultados da avaliação do tempo de armazenamento, Independente do tratamento (I 0%, 0,5% e 1,0% de L-Gln e L-Glu na dieta) para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse oxidativo do sêmen de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Gln e L-Glu).

Nos parâmetros Motilidade total, Lesão de acrossoma e lesão de membrana plasmática foi constatada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento independente do tratamento, sendo constatado que, para Motilidade total teve uma redução na média de $89 \pm 9,3\%$ para $73 \pm 5,4\%$. De certa forma, era esperado uma redução da Motilidade total nas amostras armazenadas pelo maior período de tempo (D5= 120:00h).

Tabela 6: Média e erro padrão da média (EPM) do tempo de armazenamento independente do tratamento para Motilidade total, Lesão de Acrossoma, Lesão de Membrana Plasmática e Estresse Oxidativo do Sêmen resfriado de cachacos que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L- Glutamina e L- ácido glutâmico).

Variável	Tempo de armazenamento		P<0,05
	D1=24:00h	D5=120:00h	
	Trat. (0,0%;0,5% e 1,0%)	Trat. (0,0%;0,5% e 1,0%)	
MT	89±9,3a	73±5,4b	0,033486
LA (%)	11,78±0,84b	24,52±1,67a	0,000001
LMP (%)	18,15±1,41b	26,08±1,7a	0,000456
EOS (%)	45,14±3,32	49,55±2,71	0,472871

^{ab}Letras diferentes na indicam diferença estatística ($p<0,05$). D1= 24h de armazenamento; D5= 120h de armazenamento; Motilidade Total; LA= Lesão de Acrossoma; LMP= Lesão de Membrana Plasmática e EOS= Estresse Oxidativo do Sêmen.

Embora tenha ocorrido redução nos valores de motilidade no (D5=120:00h) de armazenamento, os valores aqui encontrados estão aceitáveis para serem utilizados no momento da inseminação.

De acordo com o CBRA (2013), o percentual de motilidade espermática desejável para o sêmen resfriado no momento da inseminação artificial (IA) deve ser $\geq 50\%$. Nesse sentido, os resultados aqui encontrados nos dois tempos de avaliação, com uso de L-Gln e L-Glu, são satisfatórios para inseminação.

Para lesão de acrossoma a média aumentou de 11,78±0,84 no (D1) para 24,52±1,67 no (D5), indicando que o maior tempo de armazenamento, nesse caso, foi prejudicial para a qualidade das doses inseminantes.

A avaliação da integridade do acrossoma fornece informações do reprodutor, mas também do processamento e das condições de armazenamento das doses (Johnson *et al.*, 2000).

O espermatozoide suíno é uma célula que possui características particulares comparado às demais espécies; tais características o torna suscetível a danos estruturais e de funcionalidade em baixas temperaturas e a longos períodos de armazenamento.

É citado também por Leahy e Gadella (2011) e Yáñez-Ortiz *et al.* (2022) que esses processos podem causar instabilidade da membrana, resultando em distúrbio lipídico e integridade acrossômica comprometida. Consequentemente, a capacidade de fertilização do espermatozoide suíno é significativamente reduzida.

É sugerido neste estudo que o aumento significativo ($p<0,05$) entre as médias (D1=11,78±0,84 e D5=24,52±1,67) no tempo de armazenamento independente do tratamento se deu em função dessas características particulares da célula espermática de suíno que foram

agravadas pela exposição às baixas temperaturas, bem como no decorrer do período de armazenamento.

Um fato relevante citado por Khoi *et al.* (2021) é que, apesar das melhorias substanciais feitas nas formulações diluentes nos últimos anos, a qualidade do esperma armazenado diminui ao longo do tempo, principalmente devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a preservação.

Em estudos *in vitro*, com explante de tecido tubárico (Waberski *et al.*, 2006) ou suspensão de células de oviduto livres (Fazeli *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2001), somente espermatozoides com acrossoma intacto e não capacitados foram capazes de aderir às células de oviduto, enquanto que os já capacitados apresentaram reduzida capacidade de adesão.

A citação acima mostra a importância de se ter doses inseminantes com valores recomendados para espermatozoides com lesão de acrossoma, dada sua importância para o processo de fertilização, visto que alterações na integridade do acrossoma reduzem a capacidade de fertilização.

Para o parâmetro Lesão de Membrana Plasmática, independente do tratamento, foi constatada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento, sendo observado um aumento da média dessa lesão, que passou de $18,15 \pm 1,41$ no (D1) para 26,0839% no (D5), mostrando também que o maior tempo de armazenamento contribuiu para a redução de células espermáticas com membrana plasmática íntegra ($P < 0,000456$), lesão essa que pode comprometer os índices de fertilização.

Esse comportamento foi observado por Menegat (2016), em que a porcentagem de integridade da membrana declinou ao longo do tempo de armazenamento ($89,5 \pm 1,4\%$ em 72 h vs. $77,8 \pm 2,6\%$ em 168 h; $P < 0,0001$).

A membrana plasmática do espermatozoide exerce papel fundamental na proteção do conteúdo celular, na troca seletiva de inúmeros elementos, bem como na interação bioquímica que proporciona o bom desempenho espermático até a fusão das membranas plasmáticas com o oócito, posterior fertilização e subsequente formação do zigoto.

A reação acrossômica é o evento que ocorre quando os espermatozoides penetram entre as células foliculares e atingem a zona pelúcida, havendo o contato entre os gametas masculino e feminino. Desse modo, há exocitose de enzimas existentes no acrossoma da cabeça do espermatozoide, que são responsáveis por degradar a camada gelatinosa da zona pelúcida, permitindo que os receptores da membrana plasmática da cabeça do espermatozoide sejam reconhecidos pelos receptores específicos na membrana do oócito II, dessa forma, permitindo sua penetração no oócito (Moreira, 2014).

Os resultados desta pesquisa estão em conformidade com pesquisas que também constataram aumento na média de lesão de acrossoma e aumento de lesão de membrana plasmática à medida que se aumentou o tempo de armazenamento entre 15°C e 18°C.

Severo (2009), trabalhando com adição de cisteína no sêmen resfriado, observou em suas avaliações que a porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossômica e integridade de membrana plasmática diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, e foi menor em 72h comparados aos tempos de 0h e 48h de conservação.

No mesmo estudo, Severo (2009) constatou que menos de 65% dos espermatozoides apresentavam membrana plasmática intacta em todos os tratamentos utilizados, e que os grupos BTS, CYS0.1, CYS0.5, CYS1.0, CYS2.5, CYS5.0 e CYS10.0 produziram mais de 60% de quebra na integridade da membrana acrossômica após 72 h, quando armazenados a 17 °C.

Santos (2022), também utilizando L-cisteína para a avaliação de parâmetros espermáticos, constatou percentual de $(78,84 \pm 1,2)$ de células espermáticas com membrana plasmática intacta durante o armazenamento a 17°C.

Esse mesmo autor, Santos (2022), destaca que, embora a porcentagem de defeitos acrossômicos não tenha sido influenciada pelo tratamento ($P = 0,32$), a porcentagem de células espermáticas com defeitos acrossômicos aumentou ($P < 0,01$) ao longo do tempo de armazenamento ($0,80 \pm 0,09$, $2,40 \pm 0,09$ e $3,19 \pm 0,09\%$, por 24, 72 e 120 h, respectivamente).

No presente estudo, que utilizou L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de cachacos para avaliação de parâmetros espermáticos de sêmen resfriado entre 15°C e 18°C, foi possível constatar comportamentos semelhantes nos resultados alcançados, pois houve também aumento significativo ($p < 0,05$) tanto no percentual de lesão de acrossoma quanto na média de lesão da membrana plasmática, como demonstrado na (Tabela 4).

Quando foi feita a avaliação do estresse oxidativo do sêmen, independente do tratamento, não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) dos índices de estresse oxidativo durante o armazenamento, o resultado registrado (Tabela 6) mostra que para o D1 de armazenamento, a média registrada foi de $45,14 \pm 3,32$, e para o D5, a média obtida foi de $49,55 \pm 2,71$, com registro do valor de $P = 0,472871$.

Os espermatozoides são vulneráveis a danos oxidativos devido a uma baixa quantidade de citoplasma, altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados e proteção antioxidante inadequada (Aitken *et al.*, 2016; Gavella e Lipovac, 2013; Lenzi *et al.*, 2000).

Surpreendentemente, os achados deste estudo mostram que não houve aumento significativo ($p > 0,05$) nos índices de estresse oxidativo do sêmen, independentemente do

tratamento (0,0%, 0,5% ou 1,0% de inclusão dos aminoácidos L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta) durante o período de armazenamento (D1 = 24h e D5 = 120h).

No processo de redução do oxigênio para a formação de energia, são inseridos quatro elétrons na molécula de O₂; após cada adição de elétron, há a formação de uma molécula transitória denominada de espécie reativa de oxigênio (ERO) (Magnani; Mattevi, 2019; Snezhkina *et al.*, 2019).

Esse processo ocorre naturalmente na célula espermática, visto que há uma grande demanda por energia para que ocorram todos os eventos metabólicos que o espermatozoide necessita e, dentre essas demandas, destaca-se a motilidade.

Dutta *et al.* (2019) destacam que os espermatozoides podem produzir EROs em duas vias distintas: na membrana plasmática via sistema NADPH oxidase e na mitocôndria, pela reação redox NAD-dependente.

Por esta razão, os resultados aqui obtidos causaram surpresa, de certa forma, visto que, conforme entendimento, este estudo sugere que, independentemente dos tratamentos (0,0, 0,5% e 1,0% de inclusão de L-Gln e L-Glu) poderia haver aumento nos valores dos índices de estresse oxidativo do sêmen suíno ao longo do tempo de armazenamento (D1 = 24h a D5 = 120h), como mostrado anteriormente para os parâmetros (LMA e LMP), o que não foi constatado (P= 0,472871) nesse estudo para o (EOS).

A partir desse parágrafo, serão apresentados e discutidos os resultados da avaliação da qualidade espermática do sêmen pós-descongelado de cachaços que receberam dietas com níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L-glutamina e L-ácido glutâmico.

Os resultados apresentados na (Tabela 7) referem-se à avaliação da cinética espermática do sêmen pós-descongelado, realizada em sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), apontam que não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) nos parâmetros avaliados para a cinética espermática do sêmen pós-descongelado de cachaços que receberam dietas com níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0%) de L-glutamina e L-ácido glutâmico.

Tabela 7: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros cinéticos de acordo com a coleta (C1; C2 e C3) e tratamentos (0,0%, 0,5% e 1,0%) do sêmen pós descongelado de cachaaos que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0% de L- Gln e L- Glu).

Variável	Período de Coleta									p- valor
	Trat % (C1)			Trat % (C2)			Trat % (C3)			
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0	
MT	49,0±9,7	39,0±4,9	32,6±0,9	32,3±8,2	36,8±5,8	31,0±1,8	34,8±4,7	33,3±3,3	29,8±2,1	0,106
MP	22,1±2,3	28,6±1,5	23,8±2,2	20,0±3,2	23,5±1,3	21,6±2,1	19,6±2,0	18,3±2,3	16,7±2,0	0,804
ALH	7,8±1,0	6,0±1,0	7,5±0,6	6,1±1,0	11,2±0,9	5,6±0,7	4,0±0,4	4,3±0,2	7,2±0,7	0,222
BCF	30,8±1,0	29,5±1,7	35,7±3,8	49,3±1,0	55,4±5,4	52,8±8,5	36,1±5,1	33,1±2,1	47,0±4,1	0,619
DAP	41,7±1,0	33,5±5,7	37,4±1,7	11,1±1,0	15,9±0,2	10,8±1,2	13,3±2,2	13,3±2,7	19,0±3,0	0,462
DCL	86,5±1,0	66,5±15,5	80,1±4,5	25,5±1,0	35,6±0,1	24,0±3,5	24,2±2,1	24,5±4,0	34,8±7,7	0,402
DSL	9,2±1,1	8,0±0,9	8,5±0,3	11,6±1,5	11,4±1,2	10,0±0,7	9,5±0,7	7,7±1,5	9,2±1,3	0,430
LIN	29,6±1,0	42,8±6,7	33,9±1,0	29,1±1,0	28±1,5	31,8±5,0	50,2±9,8	48,2±2,3	41,0±2,2	0,464
STR	71,1±1,0	81,2±3,4	78,7±1,3	84,1±1,0	89,5±0,8	83,3±6,0	87,2±1,9	94,3±0,2	89,4±2,1	0,928
VAP	67±1,0	52,6±10,0	56,6±3,5	29,7±1,0	53,8±1,5	26,2±2,2	26,2±3,1	27,1±3,2	43,1±5,7	0,313
VCL	177±1,0	149±21,7	154±5,5	159±1,0	167±8,6	124±14,7	132±11,7	122±13,1	116±0,3	0,332
VSL	141±1,0	103±26,0	120±9,0	61,9±1,0	114±3,1	55,4±2,0	47,7±3,5	48±4,5	79,2±17,0	0,256
WOB	49,2±1,0	54,3±4,5	47,6±0,6	47,8±1,0	53,2±1,1	47,9±4,3	60,5±7,6	58,1±1,5	58,5±4,5	0,380

^{ab}Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). C1= ; C2= ; C3= ; MT = Motilidade total (%); PM = Motilidade progressiva (%); ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça (µm); BCF = Frequência de batimento flagelar cruzado (Hertz); DAP = distância média do percurso (µm); DCL = distância curvilínea (µm); DSL = distância em linha reta (µm); LIN= Linearidade (%); STR = retidão (VSL/VAP); VAP = velocidade média de percurso (µm/s); VCL = velocidade curvilínea (µm/s); VSL = velocidade em linha reta (µm/s); WOB = oscilação (VAP/VCL).

Os resultados dos parâmetros motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), obtidos nesse estudo, são numericamente maiores do que os encontrados por Philippe *et al.* (2023), que usaram um protocolo de congelamento de sêmen suíno em uma etapa com diferentes crioprotetores.

Neste estudo, os valores para motilidade total variaram entre $29,8 \pm 2,1$ e $49,0 \pm 9,7\%$ nas três coletas avaliadas. Já para motilidade progressiva, os valores médios foram de $16,7 \pm 2,0\%$ e $28,6 \pm 1,5\%$.

No trabalho de Philippe *et al.* (2023) os valores médios ficaram entre $22,2 \pm 2,6$ e $8,2 \pm 1,0$ para motilidade total e $16,5 \pm 2,5$ e $4,8 \pm 0,9$ para motilidade progressiva.

No estudo realizado por Lee *et al.* (2023), quando foi avaliado, o efeito do extensor de congelamento magnetizado nos danos de membrana, motilidade e fertilidade do esperma de suínos, os valores médios para porcentagem de motilidade total ficaram entre $36,2 \pm 2,7$, e $42,1 \pm 2,1$ e para motilidade progressiva, os valores $17,0 \pm 2,7$ e $21,6 \pm 1\%$.

A literatura é enfática em afirmar que as baixas temperaturas às quais as células espermáticas de suíno são submetidas no processo de criopreservação têm efeitos danosos e acentuados na estrutura e funcionalidade dessas células, quando comparadas com as de outras espécies de animais de produção.

De acordo com Torres *et al.* (2016), esses danos ocorrem nas estruturas das células, que acabam levando a perdas funcionais, como, por exemplo, a quebra da assimetria bilipídica da membrana plasmática do espermatozoide, que leva a uma perda da capacidade deste em manter sua homeostase.

De Mercado *et al.* (2009) utilizaram concentrações de (0, 10, 20, 40 e 80 mM de L-glutamina) para criopreservação de espermatozoides suínos e obtiveram valores médios para motilidade total entre 45,5% e 50,2%.

Um ponto importante a ser destacado neste estudo é que os aminoácidos L-Gln e L-Glu, utilizados para a avaliação da qualidade espermática no pós-descongelamento, foram incluídos de forma *on top* na dieta dos cachorros e, por esse motivo, considerou-se os resultados promissores frente aos resultados aqui apresentados.

Esses e os demais resultados apresentados para os parâmetros motilidade total e progressiva mostram que, apesar de haver um grande empenho em se buscar melhores resultados nos parâmetros de qualidade espermática do sêmen pós-congelamento, os resultados ainda estão muito aquém quando comparados aos resultados obtidos para o sêmen resfriado entre 15°C e 18°C.

Os resultados da avaliação dos demais parâmetros — amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), distância média do percurso (DAP), distância curvilínea (DCL), distância em linha reta (DSL), linearidade (LIN), retidão (STR), velocidade média de percurso (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta VSL e oscilação WOB, estão dentro dos encontrados na literatura.

No estudo de Caamanõ *et al.* (2021), os resultados obtidos para os parâmetros velocidade média de percurso (VAP), velocidade em linha reta VSL e oscilação WOB, são próximos dos valores encontrados neste estudo. No entanto, os valores médios para (ALH) encontrados neste estudo foram superiores, ficando entre 4,3 e 11,2 contra 1,6 a 2,0 no trabalho citado.

No mesmo estudo de Caamanõ *et al.* (2021), que avaliou a qualidade espermática pós-descongelamento de uma raça específica, foi possível constatar valores superiores em vários parâmetros quando comparados aos do presente estudo, que utilizou L-Gln e L-Glu na dieta para avaliação da qualidade espermática pós-descongelamento de 4 linhagens.

Pode-se observar que, de acordo com os trabalhos aqui citados, ocorrem variações nos resultados apresentados e as causas exatas dessas variações não são bem compreendidas.

Na (Tabela 8) encontram-se os resultados obtidos na avaliação realizada por citometria de fluxo para os parâmetros: Lesão de membrana plasmática (LMP), Lesão de acrossoma (LA), Estresse Oxidativo do Sêmen (EOS) e Lesão de Cromatina (LC); do sêmen pós-descongelado de cachorros que receberam dietas contendo níveis crescentes (0,0%, 0,5% e 1,0% de L-Glutamina e L-ácido glutâmico).

Tabela 8: Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros Lesão de membrana plasmática (LMP), Lesão de acrossoma (LA), Estresse Oxidativo do Sêmen (EOS) e Lesão de Cromatina (LC) do sêmen pós descongelado de cachorros que receberam dietas contendo níveis crescente (0,0%, 0,5% e 1,0% de L- Glutamina e L- ácido glutâmico).

Variável	% AminoGut			p-valor
	0,0	0,5	1,0	
LMP (%)	37,2±4,6	36,0±4,3	34,0±2,5	0,877
LA (%)	48,1±3,7	55,5±2,3	51,9±4,4	0,419
EOS (%)	4,3±2,2	10,0±4,0	8,0±3,8	0,579
LC (%)	50,0±5,6	49,0±6,4	50,0±3,5	0,972

^{ab}Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). AminoGut= L- glutamina e L- ácido glutâmico; LMP= Lesão de Membrana Plasmática; LA= Lesão de Acrossoma e EOS= Estresse Oxidativo do Sêmen e LC= Lesão de cromatina.

Os resultados (Tabela 8) mostram que na avaliação realizada por citometria de fluxo, não foi constatada diferença estatística ($p > 0,05$) para os parâmetros LMP = Lesão de Membrana

Plasmática, LA = Lesão de Acrossoma e EOS = Estresse Oxidativo do Sêmen e LC = Lesão de cromatina.

Para a lesão de membrana plasmática, o percentual médio entre os tratamentos variou entre $34,0 \pm 2,5$ e $37,2 \pm 4,6$, sendo possível constatar o quanto a célula espermática de suínos é sensível a baixas temperaturas quando submetida ao processo de criopreservação.

Sobre essa fragilidade da membrana plasmática do espermatozoide suíno, Casas e Flores (2013) citam que os espermatozoides dos suínos possuem membrana plasmática rica em ácidos graxos poli-insaturados e com baixo teor de colesterol, o que os torna particularmente vulneráveis a danos e choque térmico quando comparados com espermatozoides de outras espécies.

Pedrosa *et al.* (2021) em seu estudo, encontrou percentual médio de $42,19 \pm 3,07$ e $27,67 \pm 4,53$ para integridade de membrana plasmática de célula espermática de suíno, sendo que os maiores valores foram enquadrados pelo autor como sendo de sêmen com alta congelabilidade e os menores valores de integridade de membrana plasmática sendo de baixa congelabilidade.

Os valores encontrados neste estudo para (LMP) estão acima dos encontrados por Pedrosa *et al.* (2021), e, de acordo com a classificação apresentada em seu trabalho, os resultados deste estudo (Tabela 8) se enquadrariam como sendo sêmen de alta congelabilidade.

Um aspecto importante citado por Yeste *et al.* (2010) é que a preservação da integridade da membrana plasmática é essencial para a função espermática e serve como um indicador preditivo da fertilidade.

Bortolozzo *et al.* (2005) afirmam que o aumento na permeabilidade da membrana torna o espermatozoide incapaz de manter a concentração intracelular necessária e impossibilita o correto funcionamento da célula, e por isso, a presença de uma membrana celular intacta é crucial para o adequado comportamento da célula espermática.

Ainda na pesquisa de Pedrosa *et al.* (2021), os valores para o percentual de integridade do acrossoma foram de $49,30 \pm 4,96$ e $49,73 \pm 12,65$, e não diferiram entre si ($p > 0,05$), de acordo com o agrupamento de alta ou baixa congelabilidade do sêmen. Neste estudo, que utilizou inclusão de (0,0, 0,5 e 1,0% de L-gln e L-glu) na dieta de cachaços, os resultados encontrados para o percentual de lesão de acrossoma foram semelhantes ($48,1 \pm 3,7$; $55,5 \pm 2,3$ e $51,9 \pm 4,4$).

É válido que as pesquisas busquem meios que possam minimizar os efeitos danosos ao acrossoma, dada a sua importância, visto que danos a essa região têm impacto direto no processo de fertilização.

Para o estresse oxidativo do sêmen o percentual médio ficou entre $4,3 \pm 2,2$ e $8,0 \pm 3,8$, e para lesão de cromatina o percentual médio variou entre $49,0 \pm 6,4$ e $50,0 \pm 5,6$.

O estresse oxidativo é um dos efeitos deletérios que ocorrem durante os danos causados pelo congelamento e descongelamento, causados pelo aumento de radicais livres no corpo, o que leva a alterações na estrutura e função das células e, finalmente, leva à apoptose e até mesmo à necrose das células (Gong *et al.*, 2014).

Na reprodução, o estresse oxidativo é investigado como sendo também um provável contribuinte da disfunção reprodutiva masculina.

É provável que o estresse oxidativo seja uma ponte que liga a DS e a disfunção reprodutiva masculina, uma vez que o estresse oxidativo tem sido implicado em patologias induzidas pela síndrome do sono (Gao *et al.*, 2019), bem como na patogênese da disfunção reprodutiva masculina (Akhigbe, 2020; Akhigbe *et al.*, 2021).

De acordo com Dutta *et al.* (2019), os espermatozoides podem produzir EROS em duas vias distintas: na membrana plasmática via sistema NADPH oxidase e, na mitocôndria, pela reação redox NAD-dependente.

Os aminoácidos L-Gln e L-Glu têm participação no processo de defesa contra as espécies reativas ao oxigênio pelo fato de que podem ser utilizados como substrato para a biossíntese de glutathione, que por sua vez, atua diretamente contra o estresse oxidativo no organismo animal.

Essas evidências foram comprovadas por Nur (2011), que constatou que após o estresse oxidativo, a glutamina se torna o substrato para a biossíntese da glutathione reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático estabelecido.

Outro parâmetro avaliado nesse estudo foi a lesão de cromatina (LC) e, assim como nos demais parâmetros apresentados na (Tabela 8), não foi constatada diferença estatística ($P=0,972$) entre os valores encontrados de acordo com cada tratamento.

A avaliação da integridade da cromatina do espermatozoide suíno tem despertado cada vez mais o interesse por pesquisar de forma aprofundada as modificações que vão além da lesão ocorrida durante o processo de criopreservação.

Estudos anteriores em espécies humanas e suínas mostraram que a cromatina espermática pode sofrer alterações importantes após o procedimento de congelamento-descongelamento, resultando em uma maior compactação dos núcleos dos espermatozoides (Kvist *et al.*, 1998).

Neste estudo, valores elevados de lesão de cromatina foram encontrados na avaliação de qualidade espermática no pós-descongelamento do sêmen suíno. Os percentuais médios para

a referida lesão foram de $(50,0 \pm 5,6; 49,0 \pm 6,4 \text{ e } 50,0 \pm 3,5)$, de acordo com os tratamentos (0,0; 0,5 e 1,0% de inclusão de L-Gln e L-Glu), respectivamente.

De Mercado *et al.* (2021), em seu estudo avaliando a qualidade espermática pós-descongelamento, encontrou valores de até 15% para cromatina descondensada.

A compactação da cromatina do esperma é crucial para os espermatozoides suínos devido à sua estrutura peculiar, tornando-os únicos entre outras espécies domésticas (Batista *et al.*, 2016; Gosálvez *et al.*, 2011).

Por outro lado, a hiperestabilidade da cromatina espermática pode atrasar a formação nuclear paterna durante a fertilização (Rosenborg *et al.*, 1990; Huret, 1983), o que pode induzir morte embrionária precoce ou menor desenvolvimento embrionário, frequentemente observado após inseminação artificial com sêmen suíno congelado (Lwoff *et al.*, 1987).

Neste estudo, embora não tenham sido realizadas outras avaliações específicas para a cromatina, os altos valores de lesão desta evidenciam os desafios a serem superados na busca por melhores resultados do sêmen suíno criopreservado para posterior uso na inseminação.

4 CONCLUSÃO

Em suma, os níveis de inclusão de L-glutamina e L- ácido glutâmico utilizados neste estudo como suplemento na dieta de suínos machos reprodutores não proporcionaram efeitos significativos nos parâmetros avaliados do sêmen resfriado e do sêmen pós-descongelado, sendo constatado somente efeito do tempo de armazenamento na qualidade do sêmen resfriado em temperaturas entre 15°C e 18°C.

5 REFERÊNCIAS

ABREU, A.C.M.R.; WEISS, R.R.; BUSATO, E.M., DITTRICH, R. Control of *Neospora caninum* in semen of bull. **Archives of Veterinary Science**, v.26, n.1, p.80-91, 2021.

AJINOMOTO DO BRASIL INDUSTRIA E COMERCIO DE ALIMENTOS Ltda. Disponível em: <https://assets.websitefiles.com/59f8dee3a38c420001ec96ab/60d263f23aa635420b04766f_pt-ft-AminoGut_Ficha%20Tecnica_Jun21.pdf> Acesso: agost. 24, 2024.

AITKEN, R. J. et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 1-10, 2016.

AKHIGBE, R. E.; HAMED, M. A.; AREMU, A. O. HAART exacerbates testicular damage and impaired spermatogenesis in anti-Koch-treated rats via dysregulation of lactate transport and glutathione content. **Reproductive Toxicology**, v. 103, p. 96-107, 2021.

AKHIGBE, R.; AJAYI, A. Testicular toxicity following chronic codeine administration is via oxidative DNA damage and up-regulation of NO/TNF- α and caspase 3 activities. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0224052, 2020.

ALMUBARAK, A. M. et al. Washing solution and centrifugation affect kinematics of cryopreserved boar semen. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 65-75, 2021.

ANDRADE, A. F. C. et al. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.43, n.2, p.89-96, 2019.

BATISTA, C.; VAN LIER, E.; PETROCELLI, H. Dynamics of sperm DNA fragmentation in raw boar semen and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 5, p. 774-780, 2016.

BORTOLOZZO, F. P. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Pallotti, 2005.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J. et al. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1466-1479. e3, 2012.

CAAMAÑO, José Néstor et al. Post-thaw sperm quality and functionality in the autochthonous pig breed Gochu Asturcelta. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1885, 2021.

CASAS, I.; FLORES, E. Gene banking: the freezing strategy. In: **Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 551-588, 2013.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

DAVYDOV, V. V.; SHESTOPALOV, A. V.; GRABOVETSKAYA, E. R. Physiological significance of oxidative stress and its role in adaptation of the human body to deleterious factors. **Frontiers in Biology**, v. 13, p. 19-27, 2018.

DE MERCADO, E. et al. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 149-157, 2009.

DUTTA, S; MAJZOUB, A; AGARWAL, A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. **Arab journal of urology**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2019.

ESTEINE, M. J.; HARPER, A. F.; TIDEWATER, A. R. E. C.; KNIGHT, J. K. Enhanced fertility in boars fed diets supplemented with Sel-Plex® selenium. **Technical Articles-PigIndustry**, 2009.

FAZELI, A. et al. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 4, p. 879-886, 1999.

GALIĆ, I. et al. Effect of an Antioxidant Supplement Combination on Boar Sperm, **Animals**, v. 12, p. 1301, 2022.

GAO, T. et al. Role of melatonin in sleep deprivation-induced intestinal barrier dysfunction in mice. **Journal of pineal research**, v. 67, n. 1, p. e12574, 2019.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. Protective effects of exogenous gangliosides on ROS-induced changes in human spermatozoa. **Asian journal of andrology**, v. 15, n. 3, p. 375, 2013.

GONG, Gu et al. Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e89450, 2014.

GOSÁLVEZ, J. et al. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 12, p. 951-961, 2011.

GREEN, C. E. et al. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. **Reproduction-Cambridge-**, v. 122, n. 2, p. 305-315, 2001.

HALLBERG, Ida et al. Sperm quality and in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa stored at 4° C versus conventional storage for 1 week. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1444550, 2024.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HURET, J. L. Variability of the chromatin decondensation ability test on human sperm. **Archives of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 1983.

JOHNSON, L. A. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 143–172, 2000.

JOVICIC, M.; CHMELÍKOVÁ, E.; SEDMÍKOVÁ, M. Cryopreservation of boar semen. **Czech J. Anim. Sci.** v. 65, p. 115–123, 2020.

KHOI, H. X. *et al.* Monitoring the reactive oxygen species in spermatozoa during liquid storage of boar semen and its correlation with sperm motility, free thiol content and seasonality. **Andrologia**, v. 53, n. 11, p. e14237, 2021.

KUMARESAN, A. *et al.* Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 162–171, 2009.

KVIST, U. *et al.* Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertile men and men in barren unions. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 1988.

LABÊTA, C. P. S. *et al.* Efeito da vitamina E (α -Tocoferol) e de diferentes temperaturas na viabilidade de sêmen suíno refrigerado. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 3, p. 152-159, 2017.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, p. 7-13, 2011.

LEE, S. *et al.* Effect of magnetized freezing extender on membrane damages, motility, and fertility of boar sperm following cryopreservation. **Animals**, v. 13, n. 4, p. 634, 2023.

LENZI, Andrea *et al.* Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 2000.

LWOFF, L.; BEZARD, J.; PAQUIGNON, M. Comparaison de technologies de conservation des spermatozoides de verrat, effet sur les mecanismes de la fecondation. 1987.

MAGNANI, F.; MATTEVI, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, [s. l.], v. 59, p. 91–97, 2019.

MENEGAT, M. B. **Avaliação de parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo frente à homeogeneização de doses de sêmen suíno armazenadas em diferentes diluentes**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Reprodução de Suínos) - Programa

de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Santa Maria.

MOREIRA, C. Reação Acrossômica. *Revista Ciência Elementar*, v.2, n.1, p.1-7, 2014.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, p. 153-163, 2003.

NUR, E. et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 11, p. 1412-1417, 2011.

OLIVEIRA, N. G. et al. Perfil Socioeconômico do Município de São Carlos/SC: uma contribuição para o Planejamento do Desenvolvimento Local, p. 7, 2019. Disponível em:<<https://aceleracaoregional.com.br/admin/administrativo/assets/documentos/8a26ebe15760ada0f986b7e8a9493e76sao-carlos.pdf>> Acessado: 23, agosto. 2024.

PEDROSA, A. C. et al. Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. **Theriogenology**, v. 174, p. 60-72, 2021

PHILIPPE, M. G. et al. Use of a one-step freezing protocol for boar sperm with distinct cryoprotectants. **Ciência Rural**, v. 54, p. e20220090, 2023.

R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Viena: The R Foundation for Statistical Computing; 2011.

RECH, R. D. et al. **Adição de ácido clorogênico ao diluente de sêmen suíno com maior sensibilidade ao resfriamento: avaliação dos parâmetros espermáticos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria.

ROSENBORG, L. et al. Changes in human sperm chromatin stability during preparation for in-vitro fertilization. **International journal of andrology**, v. 13, n. 4, p. 287-296, 1990.

SALMON, V. M. et al. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. **Animal Reproduction Science**, v.177, p.1-11, 2017.

SANTOS, G. D. **Adição de l-cisteína sobre parâmetros espermáticos de doses inseminantes de sêmen suíno armazenadas à 5° C**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação Em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SEVERO, C. K. **Avaliação da adição de cisteína no sêmen resfriado para inseminação em suíno**. 2009. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária na área de Fisiopatologia da

Reprodução) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria.

SNEZHKINA, Anastasiya V. et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, n. 1, p. 6175804, 2019.

STRZEŻEK, J.; ŁAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M.. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Animal Science Papers and Reports**, v. 17, n. 4, p. 181-188, 1999.

TONIOLLI, Ricardo et al. Diferentes concentrações antibióticas adicionadas ao diluente de sêmen suíno. **Ciência Animal**, v. 33, n. 1, p. 61-70, 2023.

TORRES, M. A. et al. (2016) Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. **J. Anim. Sci.**, v. 94, 2016.

VEERKAMP, R. F.; BEERDA, B. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 68, p. S266-S273, 2007.

WABERSKI, D. et al. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 311-318, 2006.

WABERSKI, D.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A. M. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 45–48, 2011.

WABERSKI, Dagmar et al. Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 14748, 2019.

WATFORD, Malcolm; WU, Guoyao. Glutamine metabolism in uricotelic species: variation in skeletal muscle glutamine synthetase, glutaminase, glutamine levels and rates of protein synthesis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 4, p. 607-614, 2005.

WIEBKE, M. et al. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): Boar, bull, and stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106822, 2022.

WYSOKIŃSKA, A.; KONDRACKI, S. Assessment of sexual activity levels and their association with ejaculate parameters in two-breed hybrids and pure-bred Duroc and Pietrain boars. **Annals of Animal Science**, Siedlce, v. 14, n. 3, p. 559-571, 2014.

YÁNEZ-ORTIZ, I. et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106904, 2022.

YESTE, M. et al. The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. **Animal reproduction science**, v. 119, n. 3-4, p. 265-274, 2010.