

2025

Editora In Vivo



**PODER FECUNDANTE DOS ESPERMATOZOIDES
DO VARRÃO: MELHORIAS NAS CONDIÇÕES DE
CONSERVAÇÃO**

Autor: Prof. Dr. Ricardo Tonioli



EDITORA IN VIVO

**PODER FECUNDANTE DOS ESPERMATOZOIDES
DO VARRÃO: MELHORIAS NAS CONDIÇÕES
DE CONSERVAÇÃO**



Prof. Dr. Ricardo Toniolli

SOBRE O AUTOR

- * Médico Veterinário, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- * Especialista em Fisiopatologia da Reprodução, Universidade Federal de Minas Gerais.
- * Mestre em Zootecnia – Área Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- * Doutor em Ciências da Vida – Área Fisiologia da Reprodução, Universidade François-Rabelais de Tours, França.
- * Pós-Doutor em Biotecnologia de Reprodução, Escola de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista.
- * Professor Associado O, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.
 - * Ex-Presidente da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, Regional Ceará (ABRAVES-CE).
 - * Ex-Bolsista do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Nível PQ-2B.
- * Ex-Acadêmico Titular da Academia Cearense de Medicina Veterinária, Fortaleza/Ce.
- * Editor Chefe da Revista Ciência Animal, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4931712701458453>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4277-3656>

RICARDO TONIOLLI

**PODER FECUNDANTE DOS ESPERMATOZOIDES
DO VARRÃO: MELHORIAS NAS CONDIÇÕES
DE CONSERVAÇÃO**



2025



Esta obra está licenciada com uma Licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).
O conteúdo desta obra e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Editor Executivo

Dr. Everton Nogueira Silva

CEO-Editora In Vivo

Profa. Dra. Juliana Paula Martins Alves

Editor Chefe

Dr. Luís de França Camboim Neto

1 CIÊNCIAS AGRÁRIAS

- Dr. Aderson Martins Viana Neto
- Dra. Ana Paula Bezerra de Araújo
- Dr. Arinaldo Pereira da Silva
- Dr. Aureliano de Albuquerque Ribeiro
- Dr. Cristian Epifanio de Toledo
- MSc. Edson Rômulo de Sousa Santos
- Dra. Elivânia Maria Sousa Nascimento
- Dr. Fágner Cavalcante P. dos Santos
- MSc. Fernanda Beatriz Pereira Cavalcanti
- Dra. Filomena Nádia Rodrigues Bezerra
- Dr. José Bruno Rego de Mesquita
- Dr. Kleiton Rocha Saraiva
- Dra. Lina Raquel Santos Araújo
- Dr. Luiz Carlos Guerreiro Chaves
- Dr. Luís de França Camboim Neto
- MSc. Maria Emília Bezerra de Araújo
- MSc. Yuri Lopes Silva

2 CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

- Dra. Antônia Moemia Lúcia Rodrigues Portela
- Dr. David Silva Nogueira
- Dr. Diego Lisboa Rios

3 CIÊNCIAS DA SAÚDE

- Dra. Ana Luíza Malhado Cazaux de Souza Velho
- Msc. Cibelle Mara Pereira de Freitas
- MSc. Fabio José Antônio da Silva
- Dr. Isaac Neto Goes Silva
- Dra. Maria Verônyca Coelho Melo
- Dra. Paula Bittencourt Vago
- MSc. Paulo Abílio Varella Lisboa
- Dra. Vanessa Porto Machado
- Dr. Victor Hugo Vieira Rodrigues

4 CIÊNCIAS HUMANAS

- Dra. Alessandra Maria Sousa Silva
- Dr. Francisco Brandão Aguiar
- MSc. Juliana Alves Sales
- Dra. Solange Pereira do Nascimento

5 CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS

- Dr. Cícero Francisco de Lima
- MSc. Erivelton de Souza Nunes
- DR. Janaildo Soares de Sousa
- MSc. Karine Moreira Gomes Sales
- Dra. Maria de Jesus Gomes de Lima
- MSc. Maria Rosa Dionísio Almeida
- MSc. Marisa Guilherme da Frota
- Msc. Silvia Patrícia da Silva Duarte
- MSc. Tássia Roberta Mota da Silva Castro

6 CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA

- MSc. Francisco Odécio Sales
- Dra. Irvila Ricarte de Oliveira Maia
- Dra. Cleoni Virginio da Silveira

7 ENGENHARIAS

- MSc. Amâncio da Cruz Filgueira Filho
- MSc. Eduarda Maria Farias Silva
- MSc. Gilberto Alves da Silva Neto
- Dr. João Marcus Pereira Lima e Silva
- MSc. Ricardo Leandro Santos Araújo
- MSc. Saulo Henrique dos Santos Esteves

9 LINGÜÍSTICA, LETRAS E ARTES.

- MSc. Kamila Freire de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP

T663p

Toniolli, Ricardo.

Poder fecundante dos espermatozoides do varrão: melhorias nas condições de conservação [livro eletrônico]. /Autor: Ricardo Toniolli; Fortaleza: Editora In Vivo, 2025. 94 p.

ISBN: 978-65-87959-70-2

DOI: 10.47242/978-65-87959-70-2

1. Água de coco. 2. Fêmea suína. 3. Diluente. 4. Fertilidade. 5. Conservação. I. Título.
II. Autor

CDD 636

Denise Marques Rodrigues – Bibliotecária – CRB-3/CE-001564/O

APRESENTAÇÃO DO AUTOR

iv

O destino de um ser bom: incompreendido durante sua vida e apreciado após sua morte. É preciso admitir que o suíno é maltratado, ridicularizado, insultado, caluniado, e por fim, condenado à morte pelo homem. Já foi decidido há muito tempo que este quadrúpede era indigno de privilégios, sendo condenado ao ridículo eterno. Mas não acredito que o homem não o ame. As vezes ele o adora, mas à condição de que esteja morto. Desde 1665, Vincenzo Tanara, um gastrônomo da Bolonha, notou que “o leitão é comparável aos gênios que são honrados apenas após sua morte”.

Em uma reflexão filosófica, a sorte do pobre animal não tem nem mesmo o consolo de ir embora desse mundo com a satisfação de deixar à posteridade, os frutos de sua arte. Ele parte com o horrível sentimento que seus restos mortais serão objeto de festas e elogios daqueles que sobreviveram.

Se ao menos o respeitássemos um pouco durante sua vida, talvez esse último sacrifício lhe pareceria menos doloroso. Mas não! Continuamos a falar mal dele aos quatro cantos do mundo, perpetuando uma tradição oral e escrita que remonta à noite dos tempos. De fato, ele parece ser sempre julgado como o ser mais imundo da criação. É classificado de “porco”, o autor de atos baixos, morais e materiais, que pode produzir o gênero humano, entretanto, não é verificado se a espécie suína seria capaz de tais horrores.

Estudos científicos recentes, demonstraram que nosso amigo, o leitão, está longe de ser estúpido. É o animal de fazenda mais inteligente, semelhante á do golfinho e do cão. Assombrosa metamorfose desse gorducho quadrúpede rosado que, entre os celtas, é dotado de poderes mágicos e na religião tibetana, é o símbolo da origem de todas as coisas! Atributo de Déméter na Grécia, companheiro de Santo Antonio o ermitão dos cristãos, aqui está, desde a figura de cera à estatueta de ouro fino, o mais mal conhecido dos animais, de uma personalidade fascinante e múltipla.

Rendamos nossas homenagens à esse maravilhoso animal, pois, sem a participação e ajuda do mesmo, esse trabalho não poderia ter sido realizado.

(Le Cochon, Art, Histoire, Symbolisme – Robert Laffont)

Dr. Ricardo Toniolli
Prof. Associado
Faculdade de Veterinária da UECE

DEDICATÓRIA

v

Dedico esse trabalho, *in memoriam*, a minha avó Maria e a minha mãe Eni, pelo amor e confiança inabaláveis em minha vitória;

Dedico também as minhas filhas Lúcia Helena e Luciana, pelo amor, paciência e suporte;

Por fim, dedico esse trabalho ao meu filho Jean-Lucas, meu brasileiro nascido francês, por sua maturidade e alegria.

Obrigado a todos, com todo meu amor.

LISTA DE FIGURAS

vi

FIGURA 01	Estrutura química da molécula do ácido 3-indol acético.	31
FIGURA 02	Extração das frações ativas do plasma seminal.	35
FIGURA 03	Efeito do ácido 3-indol acético (IAA) durante um período de conservação de 6 dias, sobre as características da mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.	39
FIGURA 04	Efeito da concentração de cálcio (CaCl ₂) adicionado ao diluente BTS, sobre as características da mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.	41
FIGURA 05	Efeito da adição do cálcio (CaCl ₂) na concentração de 4,1mM, aos diluentes BTS e BTS + IAA (100ng/mL), sobre as características da mobilidade espermática após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.	42
FIGURA 06	Influência da taxa de diluição do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, do sêmen do varrão diluído no diluente BTS, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C.	43
FIGURA 07	Efeito do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C, com sêmen diluído no diluente BTS adicionado ou não de IAA à concentração de 100ng/mL.	44
FIGURA 08	Efeito de proteínas de origens diversas sobre as características de mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C, com sêmen diluído no diluente BTS.	45
FIGURA 09	Efeito das frações ativas do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C, com sêmen diluído no diluente BTS.	46
FIGURA 10	Influência da adição do composto IAA no diluente BTS, sobre a morfologia dos espermatozoides do varrão, conservados a 15 °C.	48
FIGURA 11	Curva de resfriamento do sêmen do varrão antes da congelação e temperaturas de adição do IAA.	70
FIGURA 12	Ação do IAA, nas concentrações de 10 e 100ng/mL, sobre a morfologia dos espermatozoides do varrão, avaliada após a descongelação.	77

FIGURA 13	Ação do IAA (100ng/mL), adicionado ou não ao diluente BTS, sobre a morfologia dos espermatozoides do varrão, avaliada após a descongelação.	78
FIGURA 14	Exemplos de variações da concentração da progesterona plasmática, em quatro marrãs, na avaliação do momento do estro.	80
FIGURA 15	Relação (%) dos resultados das inseminações artificiais em função do momento de ovulação (± 12 horas), com sêmen congelado do varrão.	82

LISTA DE TABELAS

vii

TABELA 01	Concentração de componentes do plasma seminal do varrão.	20
TABELA 02	Composição da água de coco (<i>Cocus nucífera</i>).	22
TABELA 03	Classificação da motilidade individual dos espermatozoides do varrão, de acordo com o vigor espermático, o deslocamento e os tipos de movimentos.	30
TABELA 04	Adição de cálcio e de IAA no diluente BTS.	32
TABELA 05	Formação dos lotes (tratamentos) de acordo com as diferentes concentrações do plasma seminal a uma concentração fixa de 35×10^6 spz/mL.	33
TABELA 06	Formação dos diferentes lotes (tratamentos) de acordo com o efeito do plasma seminal (1/10) a uma concentração fixa de 35×10^6 spz/mL.	34
TABELA 07	Diferentes tipos de proteínas (1/10) visando verificar seus efeitos sobre o espermatozoide supino, com o sêmen a uma concentração fixa de 35×10^6 spz/mL.	34
TABELA 08	Diferentes tratamentos visando testar as frações ativas do plasma seminal com o sêmen a uma concentração fixa de 35×10^6 spz/mL.	36
TABELA 09	Características consideradas para classificação do espermatozoide como vivo ou morto, segundo a sua coloração com vermelho congo.	36
TABELA 10	Formação dos lotes de inseminação artificial, sêmen refrigerado, de acordo com o diluente, dia de IA, dose de IA e número de espermatozoides.	38
TABELA 11	Características consideradas, nas marrãs para a avaliação da pesquisa de cio.	38
TABELA 12	Influência da adição do IAA em duas concentrações diferentes (10 e 100ng/mL), sobre as características morfológicas do espermatozoide do varrão, segundo a duração da conservação do sêmen (D1, D5, D13) a 15 °C.	47
TABELA 13	Fertilidade e prolificidade de fêmeas inseminadas com sêmen conservado no diluente BTS adicionado ou não de IAA (10ng/mL).	49
TABELA 14	Concentrações e temperaturas de adição do IAA segundo os experimentos (1 e 2) e diferentes tratamentos.	71
TABELA 15	Momentos de adição (30 °C e/ou descongelção) do IAA (100ng/mL) de acordo com os diferentes tratamentos (n=27).	72

TABELA 16	Efeito do momento de adição do IAA (10ng/mL) antes da congelação, sobre as características da mobilidade espermática do sêmen do varrão após incubação a 39 °C, por 5 minutos e 2 horas (experimento nº 01). (m±sd)	75
TABELA 17	Efeito da dose e do momento de adição do IAA (10 e 100ng/mL) sobre as características da mobilidade espermática do sêmen congelado do varrão (experimento nº 02) (m±sd)	76
TABELA 18	Avaliação da duração do estro e do momento de ovulação de marrãs, entre 20 horas e mais de 95 horas, à partir do início do cio.	79
TABELA 19	Distribuição da duração do estro e do momento de ovulação entre os diferentes tratamentos (lotes) (n = 81).	79
TABELA 20	Resultados de fertilidade e prolificidade de marrãs inseminadas com sêmen congelado, adicionado ou não do composto IAA na concentração de 100ng/mL (n = 27).	81
TABELA 21	Efeito da adição do IAA ao diluente BTS, sobre a proporção do número de embriões/corpos lúteos (CL) de marrãs inseminadas com o sêmen congelado.	83
TABELA 22	Influência do diluente BTS ou BTS + IAA, sobre as características morfológicas dos embriões aos 35 dias de gestação.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

viii

BTS	Beltsville Twaing Solution
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus centígrados
Ca⁺⁺	Íon cálcio
Cm²	Centímetro quadrado
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
GST	Glutathione S-transferase
G	Força G
IA	Inseminação artificial
IAA	Ácido 3-indol acético
mg	Miligrama
ng	Nanograma
mL	Mililitro
mM	Mili molar
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
pH	Pressão de hidrogênio
PM	Peso molecular
PS	Plasma Seminal
rpm	Rotações por minuto
SPTZ	Espermatozoide
TrF	Transferrina
X²	Teste do Qui-quadrado
%	Porcentagem

SUMÁRIO

Sobre o autor	i
Título	ii
Ficha catalográfica	iii
Apresentação	iv
Dedicatória	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO GERAL	18
REFERÊNCIAS	23

CAPÍTULO 01 27

FATORES QUE INFLUENCIAM O PODER FECUNDANTE DO SÊMEN REFRIGERADO DO VARRÃO

I. INTRODUÇÃO	27
II. MATERIAL E MÉTODOS	28
II.1. Conservação do sêmen refrigerado: Estudo <i>in vitro</i>	28
01. Animais e tratamentos dos ejaculados	28
02. Teste de Termorresistência	29
2.1. Classificação do vigor espermático	29
2.2. Classificação da motilidade espermática (%)	31
03. Adição de substâncias ao sêmen diluído	31
3.1. O ácido 3-indol acético (IAA)	31
3.1.1. A origem do IAA	31
3.1.2. Concentração do IAA	31
3.2. Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	32
3.3. Ação do cálcio sobre os espermatozoides	32

04. Plasma seminal (PS)	32
4.1. Utilização do PS em diferentes concentrações	32
4.2. Ação do plasma seminal	33
4.3. Ação de proteínas de origens diversas	34
4.4. Frações ativas do plasma seminal	35
4.4.1. Extração das frações ativas do PS	35
4.4.2. Formação dos lotes (tratamentos)	35
05. Morfologia do espermatozoide	36
5.1. Análises morfológicas	37
06. Análise estatística	37
II.2. Inseminação artificial com o sêmen refrigerado	37
01. Diluentes e formação dos lotes (tratamentos)	38
02. Aplicação das doses de sêmen (IA)	38
03. Pesquisa de cio	38
III. RESULTADOS	39
III.1. Conservação do sêmen refrigerado: Estudo <i>in vitro</i>	39
01. Mobilidade espermática: vigor e motilidade espermática	39
1.1. Ação do IAA	39
1.2. Ação do cálcio (CaCl ₂)	40
1.2.1. Efeito das concentrações crescentes de CaCl ₂	40
1.2.2. Interação do IAA com o CaCl ₂	41
1.3. Efeito do plasma seminal	42
1.3.1. Ação do PS em diferentes concentrações	42
1.3.2. Interação do IAA com o diluente	43
1.3.3. Ação de proteínas de origens diversas	45
1.3.4. Ação das frações do plasma seminal	46
02. Morfologia espermática	47
2.1. Efeito da duração de conservação do sêmen	47
2.2. Efeito do diluente sobre a morfologia dos espermatozoides	48
III. 2. Inseminação artificial com sêmen refrigerado	48
01. Fertilidade e prolificidade	48
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	50

IV.1. Conservação do sêmen refrigerado: Estudo <i>in vitro</i>	50
01. Discussão	50
02. Conclusões	55
IV.2. Inseminação artificial com o sêmen refrigerado	55
01. Discussão	55
02. Conclusões	58
V. REFERÊNCIAS	58

CAPÍTULO 02 67

CONGELAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DO VARRÃO

I. INTRODUÇÃO	67
II. MATERIAL E MÉTODOS	69
II.1. Conservação do sêmen congelado: Estudo <i>in vitro</i>	69
01. Técnica de congelamento	69
02. Descongelamento e controles	71
03. Escolha do momento de adição do IAA antes da congelamento	71
04. Escolha das diferentes concentrações do IAA	71
05. Mobilidade e morfologia espermática após descongelamento	72
II.2. IA em marrãs após conservação do sêmen congelado	72
01. Concentração do IAA e formação dos lotes experimentais	72
02. Sincronização do cio das marrãs	72
03. Coletas de sangue e dosagens hormonais	73
04. Inseminação artificial	73
05. Ecografias e análises após o abate das marrãs	74
III. RESULTADOS	74
III.1. Conservação do sêmen congelado: Estudo <i>in vitro</i>	74
01. Momento da adição do IAA antes da congelamento (experimento nº 1)	74
02. Concentração do IAA (experimento nº 2)	75
03. Morfologia espermática	76
3.1. Efeito das concentrações de IAA sobre a morfologia espermática	77
3.2. Adição do IAA (100mg/mL) ao BTS: ação sobre a morfologia	77

III.2. IA em marrãs utilizando o sêmen na forma congelada	78
01. Duração do estro e do momento de ovulação	78
02. Fertilidade e prolificidade, resultados gerais	80
03. Fertilidade em relação ao momento de ovulação	81
04. Número de embriões vivos por corpos lúteos	82
05. Peso e comprimento dos embriões	83
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	83
IV.1. Conservação do sêmen congelado: Estudo <i>in vitro</i>	83
01. Discussão	83
02. Conclusões	86
IV.2. IA em marrãs após conservação do sêmen sob congelação	86
01. Discussão	86
02. Conclusões	88
V. REFERÊNCIAS	89
CONCLUSÕES GERAIS	94
PERSPECTIVAS	95

RESUMO

Com a finalidade de prolongar o tempo de conservação do ejaculado do varrão a 15 °C, para a inseminação artificial (IA), foi estudado o efeito do ácido 3-indol acético (IAA), identificado no endosperma do *Cocos nucifera* (água de coco), com ação protetora para o espermatozoide (sptz). Duas concentrações de IAA (10 e 100ng/mL), adicionadas ao diluente de Beltsville (BTS), foram estudadas *in vitro*. O vigor, a motilidade espermática e a integridade acrossomal, foram estudadas durante um período de 6 ou 13 dias de conservação a 15 °C. As análises foram feitas após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C. O efeito do IAA foi estudado *in vivo* à concentração de 10ng/mL adicionado ao diluente BTS em inseminações de fêmeas, duas vezes por cio: 1) no dia da coleta e no dia seguinte (D0 e D1); no 5º e 6º dia após a coleta (D5 e D6). Em D0 e D1, os dois grupos de fêmeas (testemunha e IAA) foram inseminadas com 6 x10⁹sptz (3 x10⁹sptz em D0 e D1), enquanto em D5 e D6, as fêmeas do grupo IAA foram inseminadas com 6 x10⁹sptz (3 x10⁹sptz em D5 e D6). As fêmeas dos grupos testemunha e IAA, foram inseminadas com 12 x10⁹sptz (6 x10⁹sptz em D5 e D6). Nenhum efeito *in vitro* do IAA foi observado sobre o vigor e a motilidade durante um período de 6 dias. Entretanto, o IAA (10ng/mL) teve um efeito favorável sobre a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto, até o D13 (66% vs 54%; p<0,05). Nenhuma queda dos resultados de fertilidade e prolificidade foi observado nas porcas inseminadas com 12 x10⁹sptz, conservados entre 5 e 6 dias, em relação àquelas inseminadas com 6 x10⁹sptz, entre os dias D0 e D1. A fertilidade e prolificidade de porcas inseminadas com 6 x10⁹sptz conservados durante 5 a 6 dias na presença do IAA (10ng/mL) foram as mesmas que as de fêmeas inseminadas com o mesmo número de células conservadas entre D0 e D1, com ou sem IAA. Os resultados sustentaram a hipótese de que a presença do IAA permitiu a conservação do sêmen na forma líquida por 5 a 6 dias sem perda do seu poder de fecundação. A congelção do sêmen do varrão precisa de maiores estudos para o desenvolvimento de uma técnica de maior que apresente uma melhor qualidade após a descongelção. As características de vigor foram avaliadas após 5 minutos e 2 horas de incubação do sêmen em banho maria a 39 °C. Duas concentrações do IAA foram testadas: 10 e 100ng/mL. Os maiores valores de vigor após 5min de incubação foram obtidos com a dose de 100ng/mL (2,7 vs 2,3 do testemunho; p<0,05). Com relação a motilidade, no testemunho e mesmo tempo de incubação, o IAA obteve 29,7% vs 26,21% (p<0,05), respectivamente. Os melhores resultados de morfologia, foram obtidos com o IAA adicionado ao diluente de congelção à temperatura de 30 °C, e no diluente de descongelção. Após o tratamento com *Régumate*, as leitoas foram inseminadas 2x / cio com intervalo de 12 horas e com o IAA (100ng/mL) adicionado ao diluente. Fêmeas gestantes (%) aos 30 dias após a IA, obtiveram 63% com o uso do IAA vs 48% com o uso apenas do BTS (p>0,05). As melhores taxas de fertilidade foram obtidas quando o IAA foi adicionado ao diluente a 30 °C e após a descongelção. A adição de um composto de origem vegetal (IAA), extraído da água de coco, permitiu uma melhoria dos parâmetros reprodutivos do sêmen do varrão.

Palavras-chave: Água de coco; fêmea suína; diluente; fertilidade; conservação.

ABSTRACT

In order to prolong the conservation time of boar ejaculate at 15 °C, for artificial insemination (AI), the effect of 3-indole acetic acid (IAA), identified in the endosperm of *Cocos nucifera* (coconut water) was studied with protective action for sperm (sptz). Two concentrations of IAA (10 and 100ng/mL), added to Beltsville Extender (BTS), were studied in vitro. Vigor, sperm motility and acrosomal integrity were studied during a period of 6 or 13 days of storage at 15 °C. Analyzes were performed after 5 minutes and 3 hours of incubation at 39 °C. The effect of IAA was studied in vivo at a concentration of 10ng/mL added to the BTS extender in female inseminations, twice per estrus: 1) on the day of collection and on the following day (D0 and D1); on the 5th and 6th day after collection (D5 and D6). In D0 and D1, the two groups of females (control and IAA) were inseminated with 6×10^9 sptz (3×10^9 sptz in D0 and D1), while in D5 and D6, the females of the IAA group were inseminated with 6×10^9 sptz (3×10^9 sptz on D5 and D6). The females of the control and IAA groups were inseminated with 12×10^9 sptz (6×10^9 sptz in D5 and D6). No in vitro effect of IAA was observed on vigor and motility over a 6-day period. However, IAA (10ng/mL) had a favorable effect on the percentage of live spermatozoa with intact acrosome up to D13 (66% vs 54%; $p < 0.05$). No drop in fertility and prolificacy results was observed in sows inseminated with 12×10^9 sptz, conserved between 5 and 6 days, in relation to those inseminated with 6×10^9 sptz, between days D0 and D1. The fertility and prolificacy of sows inseminated with 6×10^9 sptz conserved for 5 to 6 days in the presence of IAA (10ng/mL) were the same as those of sows inseminated with the same number of conserved cells between D0 and D1, with or without IAA. The results supported the hypothesis that the presence of IAA allowed the conservation of semen in liquid form for 5 to 6 days without loss of its fecundation power. The freezing of boar semen needs further studies for the development of a larger technique that presents a better quality after thawing. The vigor characteristics were evaluated after 5 minutes and 2 hours of semen incubation in a water bath at 39 °C. Two IAA concentrations were tested: 10 and 100ng/mL. The highest values of vigor after 5min of incubation were obtained with the dose of 100ng/mL (2.7 vs 2.3 of the core; $p < 0.05$). Regarding motility, in the core and at the same time of incubation, the IAA obtained 29.7% vs 26.21% ($p < 0.05$), respectively. The best morphology results were obtained with the IAA added to the freezing diluent at a temperature of 30 °C, and in the thawing diluent. After treatment with Régumate, the gilts were inseminated 2x/estrus with an interval of 12 hour and with the IAA (100ng/mL) added to the extender. Pregnant females (%) at 30 days after AI, obtained 63% with the use of the IAA vs 48% with the use of the BTS alone ($p > 0.05$). The best fertility rates were obtained when IAA was added to the diluent at 30 °C and after thawing. The addition of a compound of vegetable origin (LAA), extracted from coconut water, allowed an improvement in the reproductive parameters of boar semen.

Keywords: Coconut water; female swine; diluent; fertility; conservation.

INTRODUÇÃO GERAL

Foi no ano de 1932 que a primeira porca é inseminada artificialmente por Milovanov, na U.R.S.S. A partir dessa data, numerosas pesquisas são desenvolvidas em matéria de inseminação artificial (IA) suína, na maioria dos países do mundo. Em 1948, o Japão se lançou na prática dessa técnica, mas somente após 1955 que o método começou a ser empregado em países como a França, a Gran Bretanha, os Países Baixos e a Bélgica (JONDET et al., 1971). No Brasil, a IA suína em escala comercial foi introduzida somente a partir de 1975, encontrando boas condições para sua implantação na região sul. Os bons resultados de fertilidade e as vantagens sanitárias e econômicas, foram responsáveis pela progressão da técnica junto aos criadores (SCHEID, 1992).

A espécie suína ocupa um lugar importante na França entre os diferentes animais de produção. Até 1993, havia uma produção de 2 milhões de toneladas de carcaças. Entretanto, a produção de carne de porco era ainda insuficiente para satisfazer a demanda dos consumidores, uma vez que a produção era deficitária de cerca de 60 mil toneladas, ou seja, perto de 3% das necessidades. Após uma evolução favorável no curso dos últimos anos, a produção francesa ficou ligeiramente excedente a partir de 1994, mas somente de 1,5% (INSTITUT TECHNIQUE DU PORC, 1995).

Durante os 30 primeiros anos, a inseminação artificial suína pouco se desenvolveu na França: o número de utilização de sêmen praticamente não progrediu. Cerca de 160.000 inseminações foram praticadas no ano de 1988. A partir de 1989, o interesse dos criadores pela criação de raças cruzadas (mestiças) e o desenvolvimento de centros de inseminação suína permitiu se dobrar a produção do número de doses de sêmen. Durante o ano de 1994, essa produção chegou a um total de 2.600.00 doses de sêmen (INSTITUT TECHNIQUE DU PORC, 1995). Nesse mesmo ano, um total de 1.300.00 porcas foram inseminadas com uma dose de sêmen. A maior parte dessa produção (95%) é enviada aos criadores pelos centros de produção (THIBIER e MALAFOSSE, 1992; INSTITUT TECHNIQUE DU PORC, 1995). A aplicação desse sêmen, deve ser feita antes de 48 horas após a coleta, efetuando-se duas inseminações por cio e por fêmea.

A inseminação artificial oferece várias vantagens para a produção suinícola, tais como: introdução de material genético nas criações com um mínimo de risco de transmissão de doenças; uma economia de lugar e de alimentação, visto que, o criador terá um menor número de reprodutores em sua granja; um aumento da pressão de seleção pela utilização do sêmen de machos superiores (SOLTI e WEKERLE, 1995) e um ganho de tempo de trabalho para os criadores.

Com a utilização da técnica da “criação em bandas”, a entrada no cio das porcas é agrupada em um período de alguns dias. O desenvolvimento de uma tecnologia que permita uma longa conservação do poder fecundante do sêmen, pode facilitar a sua utilização em um grupo de fêmeas após o desmame. Essa possibilidade permite uma utilização racional dos reprodutores e a obtenção de resultados melhores de fertilidade com o uso da inseminação artificial (PAQUIGNON et al., 1982). A utilização de um

sêmen 5 a 6 dias após a coleta sem perda significativa de seu poder fecundante, permitirá uma melhor eficácia dos protocolos de coletas semanais dos machos. Dessa forma, as fêmeas em cio poderão ser inseminadas com um sêmen proveniente de um número menor de coletas.

A conservação do sêmen na forma líquida, à temperatura de 15 °C, é o método mais largamente utilizado, sendo muito baixo o número de inseminações feitas com o sêmen congelado. Em 1984, Paquignon demonstrou que a conservação do sêmen entre 15 e 18 °C em um diluente, proporcionava ainda após três dias de conservação, resultados instáveis e insatisfatórios. Weitze (1990), fez um balanço de numerosos trabalhos destinados a melhorar a qualidade dos diluentes, a fim de aumentar o tempo de estocagem para mais de três dias após a coleta do sêmen, mas os resultados obtidos eram ainda limitados. Esse limite de tempo, restringe a conservação do sêmen do varrão e limita a utilização da técnica de inseminação artificial em uma maior escala.

A fertilidade do sêmen suíno conservado entre 15 e 18 °C, depende principalmente de três fatores: 1) A qualidade da origem do esperma ejaculado; 2) O número de espermatozoides utilizados por dose de inseminação; 3) A qualidade do diluente utilizado (JOHNSON et al., 1988; WABERSKI et al., 1990).

Com relação ao meio diluente, numerosos são os trabalhos feitos com a finalidade de desenvolver um diluente capaz de manter as características de motilidade dos espermatozoides dos mamíferos domésticos. Substâncias como o cálcio (ROBERTSON et al., 1988), o leite desnatado (SCOBAY et al., 1995) e a gema de ovo (PHILLIPS, 1939; SALISBURY et al., 1941; SCOBAY et al., 1995), foram utilizadas sendo adicionadas ao diluente do sêmen de touro, carneiro e do homem, respectivamente.

A fêmea, por sua influência sobre a quantidade e qualidade de ovócitos, tem um papel importante sobre a produtividade, entretanto, o macho tem também um papel importante no sucesso da fecundação. Já foi mostrado, com efeito, que o varrão tem uma influência direta sobre a fertilidade e o tamanho da leitegada que ele gerou (OLLIVIER e LEGAULT, 1967; SWIERSTRA e DYCK, 1976; UZU, 1979). Essa influência adquire uma importância maior, graças à prática da inseminação artificial que apresenta um certo desenvolvimento com os suínos (PAQUIGNON et al., 1988). Um reprodutor pode assegurar a fecundação de um grande número de fêmeas e dessa forma, o varrão marca consideravelmente a economia da produção pelo nível de sua própria fecundidade sem contar dos eventuais efeitos genéticos sobre a capacidade reprodutiva de seus descendentes, mesmo sendo uma qualidade de baixa herdabilidade (du MESNIL du BUISSON et al., 1974).

O domínio do poder de fecundação dos espermatozoides é primordial sob um duplo ponto de vista: 1) Zootécnico = obter a melhor fertilidade possível; 2) Científico = contribuição dos mecanismos fisiológicos que contribuem para isso. Sob esses aspectos, o varrão, pelo tamanho de seus testículos e epidídimos, bem como pela sua importante produção espermática, representa um modelo experimental muito importante (PAQUIGNON, 1989). O varrão apresenta uma produção média diária da ordem de 16 bilhões de espermatozoides. Esse valor corresponde a uma produção de 23 milhões por dia e por grama de testículo, a um número médio de 15 bilhões por ejaculado no caso, onde os animais são coletados todos os dias (THIBAUT e LEVASSEUR, 1991).

O ejaculado é formado por uma parte sólida, os espermatozoides, e uma parte líquida, o plasma seminal, o qual é produzido pelas glândulas anexas do sistema genital. Na espécie suína, um simples ejaculado pode apresentar um volume de 500mL, constituído na maior parte pelo plasma seminal (MANN, 1964). O plasma seminal, por seus numerosos componentes, de origem iônica, proteica e hormonal, confere ao ejaculado suas principais qualidades. As concentrações médias dos seus principais componentes estão apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01: Concentração de componentes do plasma seminal do varrão.

COMPONENTES	mM	COMPONENTES	Mg/100mL
Cloro	85-105	Nitrogênio total	613
Sódio	125-252	Fósforo inorgânico	17
Potássio	17-46	Fósforo total	357
Cálcio	1,5-4,6	Solução ácida de Fósforo	171
Magnésio	2,5-24	Fósforo lipídico	6
Ácido Láctico	2,2	Ergotionina	15,2
Ácido Glutâmico	2,0	Ácido ascórbico	3,5
Ácido Cítrico	2,6-10,4	Ácido úrico	3
Inositol	28	Nitrogênio não proteico	22
Sorbitol	0,4	Uréia	5
Glicerilfosforilcolina	4,0	Amônia	1,5
Glicerofosfoinositol	0,26	Enxofre	16
Creatina	0,03		
Frutose	0,5	CO₂ (mL/100mL)	50
Glicose	0,06-0,3	Proteína (mg/mL)	30
Arginina	0,01		
Ergotionina	0,7		

Hormônios e Fatores de Crescimento: Inibina, melatonina, TGFa, TGFb, Endotelina, LH, hCGbcore, prolactina, progesterona, IGF, IGF-BP2, IGF-BP5, IGF-I-BP, IGF-II-BP, ANF, calcitonina, NGF, GABA, PTH, IL-6, IL-8, IL-2 receptor solúvel, TRH.

(Fontes: MANN, 1964; KNOBIL e NEIL, 1993)

O poder fecundante se define como a aptidão do espermatozoide assegurar a fecundação dos ovócitos e o desenvolvimento de embriões viáveis. Com a inseminação artificial, ela depende fortemente das técnicas utilizadas visando a conservação dos espermatozoides (POLGE, 1956; du MESNIL du BUISSON, 1957).

A determinação da qualidade do sêmen suíno, representa uma fase importante e indispensável da manipulação do ejaculado visando a inseminação artificial. Ela permite o controle da aptidão do varrão à reprodução e constitui uma vantagem da técnica de IA em relação à monta natural. Entretanto, a influência da qualidade do esperma sobre a fertilidade não parece ser o único fator de resultados positivos na criação. Os resultados de fertilidade dependem tanto do macho quanto da fêmea, bem como de variáveis externas: o criador, a condução da criação, as instalações e as condições do meio ambiente (MARTIN RILLO et al., 1994).

Os métodos rotineiros utilizados para a avaliação da qualidade do sêmen estão baseados nas análises de certos parâmetros espermáticos (concentração, motilidade e

morfologia) e no homem, também sobre certas características do plasma seminal (volume, cor e composição química) (PAZ et al., 1977). Estes componentes importantes do ejaculado dos mamíferos domésticos, tem uma ação sobre a motilidade espermática. Iwamoto et al. (1992), demonstraram que um fator inibidor da motilidade estava presente no plasma seminal do touro e do homem. No varrão, este fator está presente, mas não impede a ação estimulante do plasma seminal sobre os espermatozoides no oviduto da porca (BRUTGANS, 1982). Ao contrário, a utilização do plasma seminal suíno nos meios de descongelamento do sêmen, obtém resultados de taxas de fertilidade mais elevadas (EINARSSON et al., 1972). Pode-se supor que certos desses constituintes orgânicos ou/ minerais, conferem ao plasma seminal certas funções favoráveis.

Os trabalhos de Williams e Savage (1925), colocaram em evidência a primeira relação entre a avaliação da qualidade do sêmen do touro e os resultados de fertilidade. Segundo Lagerlöf (1934), uma porcentagem de células anormais superior a 18%, pode ter um efeito negativo sobre as taxas de fertilidade. A correlação entre a qualidade do sêmen e a fertilidade também foi estudada por Müller (1968) em touros e por Homonnai et al. (1980) no homem, verificando-se que um sêmen tendo boas características de motilidade e morfologia era capaz de fecundar. Entretanto, em varrões, outros autores encontraram uma fraca correção, talvez nenhuma, entre a qualidade do ejaculado e a fertilidade, mesmo por parâmetros tais como a motilidade e o número total de anomalias espermáticas (GALLI e BOSISIO, 1988). Até o presente momento, não há uma definição prévia e clara, referente a um sêmen fértil, apesar de uma grande variedade de testes de laboratório (YAVETZ et al., 1995).

A congelamento permite conservar o sêmen por um longo período. Entretanto, a criopreservação de espermatozoides do varrão está associada a uma redução dos parâmetros de fertilidade, à danos a membrana após descongelamento, bem como à resultados fracos de fertilidade (EVAN e McKENNA, 1986; BUHR, 1990). Até o presente, nenhuma técnica é capaz de impedir alterações na membrana acrossomal e/ou a redução da motilidade após a descongelamento. Em relação ao sêmen refrigerado, o congelado apresenta uma queda de 30% no número de espermatozoides com acrossoma normal e de 50% ou mais, na porcentagem de espermatozoides móveis (LARSSON, 1986).

Em trabalhos anteriores (TONIOLLI, 1990 e 1991), foi demonstrado que a água de coco utilizada como diluente do sêmen do varrão, apresentou uma ação estimulante sobre os espermatozoides. O emprego de um diluente à base de água de coco ou de um extrato, deveria permitir um grande desenvolvimento da criação de suínos na região nordeste do Brasil. O fruto, *Cocos nucifera*, é uma matéria prima abundante em toda essa região. Sua composição pode ser vista na Tabela 02.

O momento e o número de inseminações, em relação ao momento de ovulação na porca, podem influenciar os parâmetros de fertilidade na porca (EVANS e McKENNA, 1986). A atenção dos pesquisadores foi direcionada a um certo número de características reprodutivas nas fêmeas, tendo-se em conta sua importância sobre os resultados das inseminações, em particular, com a utilização do sêmen congelado do varrão (BRÜSSOW et al., 1990; SOEDE e KEMP, 1993; WABERSKI et al., 1994; WEITZE et al., 1994 e 1995; MARTINT-BOTTÉ et al., 1995; SOEDE et al., 1995a e

1995b; WEITZE, 1995). Essas características são: o intervalo entre o desmame e o início do cio; a duração do cio; o intervalo entre o início do cio e a ovulação; e a duração da ovulação.

Tabela 02: Composição da água de coco (*Cocus nucífera*).

AMINO ÁCIDOS	µg/mL	AÇÚCARES	mg/mL
Aspártico	5,4	Sacarose	8,90
Glutâmico	78,7	Glicose	2,46
Serina	65,8	Frutose	2,51
Glicina	13,9	VITAMINAS	mg/mL
Asparagina	10,9	Ácido nicotínico	0,64
Treonina	26,3	Ácido pantotênico	0,52
Alanina	177,1	Biotina	0,02
Glutamina	13,4	Riboflavina	0,01
Lisina	22,5	Ácido fólico	0,003
Arginina	16,8	Tiamina	traços
Prolina	21,6	Piroxidina	traços
Valina	15,1	MINERAIS	mg/100mL
Leucina	31,7	Potássio	312,0
Fenilalanina	10,2	Cloro	183,0
Tirosina	3,1	Sódio	105,0
Aminobutírico	68,8	Fósforo	37,0
Homoserina	5,2	Magnésio	30,0
Histidina	traços	Enxofre	24,0
Metionina	traços	Ferro	0,10
Hidroxiprolina	traços	Cobre	0,04
HORMÔNIOS	ng/mL	Cálcio	traços
Auxina	40,0		

(Fonte: PERMANYER and PEREZ, 1989)

Os resultados apresentados nesse trabalho, tiveram por objetivos:

* Aprofundar os conhecimentos sobre a possibilidade de estimulação das características da motilidade espermática do sêmen in natura do varrão *in vitro*, conservado a uma temperatura de 15 °C, após o terceiro dia pós coleta;

* Estudar o efeito de uma substância de origem vegetal (IAA), extraída da água de coco (*Cocus nucífera*), sobre a conservação prolongada do sêmen do varrão a 15 °C;

* Melhorar a técnica de congelamento do sêmen do varrão, visando sua utilização na inseminação artificial e associação às técnicas de domínio do conhecimento do cio nas fêmeas suínas.

REFERÊNCIAS

- BRÜSSOW, K.P.; RATKY, W.; BECKER, F. Determination of the duration of ovulation in gilts by means of laparoscopy. **Reproduction in Domestic Animals**, v.25, p.184-190, 1990.
- BRUTGANS, Y.P. The role of boar semen plasma in fertilisation. **Referativny Zhurnal**, p.83-88, 1982.
- BUHR, M.M. Preservation of boar semen alters membrane molecular dynamics. **Reproduction in Domestic Animals**, supl.1, p.81-93, 1990.
- Du MESNIL du BUISSON, R. Conservation du sperme de verrat sans dilution: conditions d'examen. **Annales de Zootechnie**, v.4, p.391-399, 1957.
- Du MESNIL du BUISSON, R.; MILLANVOYE, B.; BARITEAU, F.; LEGAULT, C. Facteurs de variation de la production et de la qualité de la semence de verrat: effets saisonniers, héritabilité, corrélation entre variables. **Journées de Recherche Porcine em France**, Paris, v.7, p.63-70, 1974.
- EINARSSON, S.; SOOSALU, O.; SWENSSON, S. On the fertility and survival of deep frozen boar spermatozoa thawed in skim milk. **Acta Veterinária Scandinavica**, v.13, p.446-458, 1972.
- ELEVAGE INSEMINATION, **Statistiques**. 1994. p.66-67, 1992.
- EVANS, L.E.; McKENNA, D.J. **Artificial insemination of swine**. In: Current Therapy in Theriogenology. 2^a ed. (Eds D.A. Morrow). Saunders, Philadelphia, p.946-949, 1986.
- GALLI, A.; BOSISIO, M. Quality of semen stored at +15/16 °C as related to fertility of artificially inseminated swine. **Theriogenology**, v.30, p.1185-1189, 1988.
- HOMONNAI, T.Z.; PAZ, J.M.; DAVID, M.P. Quality of semen obtained from 627 fertile men. **International Journal of Andrology**, v.3, p.217-228, 1980.
- INSTITUT TECHNIQUE du PORC. **Le porc par les chiffres**, 1995. 40p.
- IWAMOTO, T.; TSANG, A.; LUTERMAN, M.; DICKSON, J.; LAMIRANDE, E.; OKUNO, M.; MOHRI, H.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.55-62, 1992.
- JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; GROOTEN, J.J.G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified Modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. **Zuchthygiene**, v.23, p.49-55, 1988.
- JONDET, R.; Du MESNIL du BUISSON, F.; SIGNORET, J.P. L'insémination artificielle de la truie. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.147, p.121-124, 1971.
- KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 1^a ed. Raven Press, New York, 1878p., 1993.

LAGERLÖF, N. Morphological studies on the sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility (Trans. Title.). **Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica**, suppl. 19, 1934. 254p.

LARSSON, K. **Evaluation of boar semen**. Current Therapy in Theriogenology, 2^a ed. (Eds D.A. Morow). Saunders, Philadelphia, p.972-975, 1986.

MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. 1^a ed. John Wiley, New York, 1964. 493p.

MARTIN RILLO, S.; SAIZ, F.; DE ALBA, C.; MARIGOTA, P.; SAGÜES, P.L. Influence de la qualité de sperme sur la fertilité en élevage porcin. **Association Française de Médecine Vétérinaire du Porc**, p.87-99, 1994.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; RICHARD, D.; MAUREL, M.C.; PLAT, M.; DESPRÉS, P.; LOCATELLI, A.; GODET, G.; LANDREVIE, J.; BUSSIÈRE, J.; RENAUD, G.; TERQUI, M. Relations entre les taux plasmatiques de LH, de progestérone d'ultrasons et le moment d'ovulation chez la cochette. **Journées de Recherche Porcine en France**, v.27, p.57-62, 1995.

MÜLLER, E. Photogrammetric experiments on the motility of diluted bovine sperm. (Trans. Title.). **Vienna Veterinary Monthly**, v.55, n.5/6, 1968.

OLLIVIER, L.; LEGAULT, C. L'influence directe du verrat sur la taille et le poids des portées obtenues par insémination artificielle. **Annales de Zootechnie**, v.16, p.247-254, 1967.

PAQUIGNON, M. Semen technology in the pig. **Current Tropical Veterinary Medicine and Animal Science**, v.30, p.202-218, 1984.

PAQUIGNON, M. **Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat: acquisition durant le transit épидidymaire et technologies de sa conservation**, Thèse de Doctorat, Montpellier, 69p., 1989.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, F.; DACHEUX, J.L.; COUROT, M. Effet du dilueur, du taux de dilution et du plasma seminal sur la fertilité des truies après une longue conservation de la semence. **Journées de Recherche Porcine en France**, v.14, p.85-90, 1982.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, F.; BARITEAU, F. Efficacité des techniques de conservation de la semence de verrat. **INRA Production Animale**, v.1, p.271-280, 1988.

PAZ, G.; HOMONAI, T.Z.; KRAICER, P.F. Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid composition and their inter-relations with sperm quality. **International Journal of Fertility**, v.22, p.140-147, 1977.

PERMANYER, J.J.; PEREZ, M.L. Compositional analysis of powdered cocoa products by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Food Science and Technology**, v.54., issue 3, p.768-769, 1989.

PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. **Journal of Biology and Chemistry**, v.130, p.415-423, 1939.

- POLGE, C. Artificial insemination in pigs. **Veterinary Record**, v.68, p.62-67, 1956.
- ROBERTSON, L.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. **The effect of incubation on membrane injury calcium movement in ram spermatozoa subjected to cold shock.** Proceeding of XI International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, v.1, p.290, 1988. (abstract)
- SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLETT, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluente and field from its use. **Journal of Dairy Science**, v.24, p.905,910, 1941.
- SCHEID, I.R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: Development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, v.26, p.299-301, 1992.
- SCOBEY, M.J.; BIELFELD, J.S.; KRÜSSEL, J.S.; JEYENDRAN, R.S. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. **Andrologia**, v.57, p.229-231, 1955.
- SOEDE, N.M.; KEMP, B. In synchronized pigs, the duration of ovulation is not affected by insemination and is not determinant for early embryonic diversity. **Theriogenology**, v.34, p.1043-1053, 1993.
- SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; KEMP, B. **Oestrus (standing response for boar and man) and ovulation in sows.** In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, 293-294, 1995a.
- SOED, N.M.; WETZELS, C.C.H.; KEMP, B. **Optimal interval between insemination and ovulation in sows, as judged by fertilization rate and accessory sperm Count of day 5 embryos.** In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, 295-296, 1995b.
- SOLTI, L.; WEKERLE, L. **Problems of short and long term preservation of boar semen.** In: XXXIX Symostium of Zootechiny, Milan, p.133-136, 1995.
- SWIESTRA, E.E.; DYCK, G.W. Influence of the boar and ejaculation Frequency on pregnancy rate and embryonic survival in swine. **Journal of Animal Science**, v.42, p.455-460, 1976.
- THIBAULT, C.; LEVASSEUR, M.C. **La reproduction chez les mammifère et l'homme.** Ellipses – INRA, Paris, 1991. 768p.
- THIBIER, M.; MALAFOSSE, A. A brief review on pig A.I. in France. **Reproduction in Domestic Animals**, supl.1, p.311-313, 1992.
- TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* do sêmen de suíno diluído na água de côco *in natura*, estabilizada e no diluidor BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, p.35-43, 1990.
- TONIOLLI, R. A. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído na água de côco, estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.15, p.133-137, 1991.

UZU, G. Influence du verrat sur les principaux paramètres de la productivité du troupeau et sur la durée de gestation. **Annales de Zootechnie**, v.28, p.315-323, 1979.

WABERSKI, D.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; HAHN, R. Spermienmotilität und morphologie em ihrer Auswirkung auf die Fruchtbarkeit von Besamungsebern in feldversuchen. **Tierärztliche Praxis**, v.18, p.591-594, 1990.

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

WEITZE, K.F. The use of “long-term extender” in pig /a./i. – a view of the international situation. **Pig News Informations**, v.11, p.23-26, 1990.

WEITZE, K.F. **Timing of artificial insemination and ovulation in breeding herds I.** In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, 193-199, 1995.

WEITZE, K.F.; WAGNER-RIETSCHER, D.; KRIETER, J. The onset of heat weaning, heat duration and ovulation as a major factors in artificial insemination timing in sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.29, p.433-443, 1994.

WEITZE, K.F.; WABERSKI, D.; WAGNER-RIETSCHER, D.; RICHETER, L.; KRIETER, J. **The onseT and duration of oestrus and the time of ovulation in primiparus sows major factors in artificial insemination timing in sows.** In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, p.301, 1995. (Abstract)

WILLIAMS, W.W.; SAVAGE, A. Observations on the seminal micropathology of bulls. **Cornell Veterinary**, v.15, p.353-375, 1925.

YAVETZ, H.; HAUSSER, L.; BOTCHAN, R.; LESSING, J.B.; HOMONNAI, Z.T.; PAZ, G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. **Andrologia**, v.27, p.31-35, 1995.

Capítulo 01

FATORES QUE INFLUENCIAM O PODER FECUNDANTE DO SÊMEN REFRIGERADO DO VARRÃO

I. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial suína, se baseia na utilização rotineira do sêmen diluído e conservado no máximo por três dias após a coleta, à uma temperatura de 15 °C. O poder fecundante do ejaculado do varrão pode ser preservado por um período de tempo maior, entretanto após o terceiro dia, a utilização de um ejaculado, assim conservado, não permite atender os níveis de fertilidade e prolificidade obtidos normalmente pela monta natural (BARITEAU et al., 1977; STRZEZEK et al., 1979; PAQUIGNON et al., 1982 e 1987; PAQUIGNON, 1984; GALLI e BOSISIO, 1988; REVELL e GLOSSOP, 1989; SONE et al., 1992).

É possível que os produtos do metabolismo dos espermatozoides, associados à contaminação do meio de conservação por bactérias capazes de se desenvolver, apesar da presença de antibióticos, possam ter um papel importante na queda da qualidade do sêmen durante a sua conservação (PAQUIGNON, 1984).

Assim sendo, necessário de faz o desenvolvimento de uma técnica simples e confiável, visando a preparação, a conservação e a utilização do sêmen do varrão durante um tempo suficiente sem perda do seu poder de fecundação (BARITEAU et al., 1977). A conservação do esperma do varrão após o segundo dia de conservação, deve permitir o desenvolvimento da inseminação artificial suína em boas condições técnicas (PAQUIGNON et al., 1980), pelas quais um papel essencial é desempenhado pelos meios de diluição e conservação (PAQUIGNON et al., 1982; WEITZE, 1990).

Na inseminação artificial suína, o diluente mais utilizado que proporciona os melhores resultados de fertilidade e de prolificidade é o diluente Beltsville Tawing Solution (BTS, glicose = 37g; citrato $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ = 6g; bicarbonato Na = 1,25g; EDTA = 1,25g; KCL = 0,3g e água destilada = 1000mL (PAQUIGNON et al., 1987; JOHNSON et al., 1988, BLICHFELDT et al., 1988; REED e CURNOK, 1991). Entretanto, a utilização desse meio está igualmente limitada a alguns dias após a coleta do sêmen: a partir do terceiro dia, a taxa de partos e o tamanho da leitegada diminuem (PAQUIGNON et al., 1982) e os resultados de fertilidade não se apresentam mais economicamente viáveis e satisfatório para os criadores.

Esses resultados, levam diferentes grupos a pesquisarem diferentes substâncias que possam apresentar um papel favorável na manutenção *in vitro* das características de motilidade dos espermatozoides, em vista de sua utilização em programas de inseminação artificial (BARITEAU et al., 1977; SLAWETA et al., 1981; PAQUIGNON et al., 1987 e 1988; GALLI e BOSISIO, 1988; SONE et al., 1992). Para

os trabalhos de criação em “bandas”, o desenvolvimento dessa prática depende da eficácia da técnica utilizada para a conservação das características espermáticas do sêmen e a manutenção de seu poder fecundante (PAQUIGNON et al., 1982; BARITEAU et al., 1984). A conservação sobre uma duração equivalente à uma semana de trabalho (6 dias), parece ser um objetivo prático interessante sobre o qual foram concentradas nossas experimentações.

Trabalhos brasileiros mostraram o efeito benéfico da adição da água de coco ao diluente do sêmen do bode e do varrão (TONIOLLI, 1989, 1990 e 1991) e do carneiro (FREITAS e NUNES, 1994). Um efeito favorável foi verificado *in vitro* sobre as características de motilidade espermática; e *in vivo* sobre os parâmetros de fertilidade. Um componente, que inicialmente foi denominado de JYP, foi identificado na constituição da água de coco, e que parece ao menos em parte, responsável por efeitos favoráveis desse meio sobre os espermatozoides (NUNES e COMBARNOUS, 1994). Na sequência dos trabalhos, o JYP foi identificado como o ácido 3-indol acético (IAA), um hormônio de origem vegetal, classificado como uma auxina. Por esse motivo é que nós procuramos descobrir se esse produto, pode igualmente ser eficaz quando adicionado ao diluente BTS, visando a conservação do sêmen do varrão.

Esse trabalho teve por objetivo, estudar em um primeiro momento, o interesse potencial do IAA, observando *in vitro*, as características de motilidade e a morfologia dos espermatozoides, bem como os resultados de fertilidade e de prolificidade de fêmeas suínas inseminadas. Foi também mensurado o efeito da adição de algumas substâncias, reputadas como favoráveis, quando adicionados ao diluente do sêmen do varrão, sobre a conservação *in vitro* dos espermatozoides, com o intuito de prolongar o seu poder de fecundação após o terceiro dia de conservação após a coleta do sêmen. Na sequência, será apresentado os efeitos desse mesmo produto sobre o sêmen congelado. Nesse primeiro capítulo, serão reportados os resultados *in vitro*, da avaliação da motilidade espermática e da morfologia dos espermatozoides.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. 1. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN REFRIGERADO: ESTUDO *IN VITRO*

01. Animais e tratamentos dos ejaculados

Os machos utilizados nesse trabalho, encontravam-se em serviço regular (na média, uma coleta de sêmen por semana) na Estação Experimental de Inseminação Artificial (SEIA), do Instituto Nacional da Pesquisa Agropecuária (INRA-SEIA), situado na cidade de Rouillé, França. Todos os ejaculados utilizados, apresentavam a qualidade exigida para a sua utilização em protocolos de inseminação artificial, com relação as características de motilidade espermática: vigor espermático ($\geq 3,0$); porcentagem de espermatozoides móveis ($\geq 75\%$) e anormalidades morfológicas totais ($\leq 40\%$). Após a coleta, o ejaculado total era filtrado sobre uma camada tripla de gaze.

Após a coleta e os controles de qualidade, cada ejaculado era repartido, com a finalidade de que uma fração fosse diluída com o diluente BTS (tratamento controle), adicionado ou não de uma substância a ser testada. Em toda experimentação (*in vitro* e *in vivo*), o sêmen foi utilizado na concentração de 35×10^6 sptz/mL, correspondendo a uma dose de sêmen com 3×10^9 sptz, em um total de 90mL de diluente, utilizado na inseminação artificial. As análises foram feitas a partir de alíquotas de 3mL de amostras de sêmen tratado dessa forma descrita. As amostras foram colocadas dentro de tubos de ensaio com capacidade para 5mL e conservadas durante 6 dias a uma temperatura de 15 °C, até o momento de sua observação e análises.

O efeito dos tratamentos foi mensurado por estimativa em microscópio óptico: 1) o vigor espermático (notas em uma escala de $\frac{1}{2}$ ponto, indo de 0 a 5); 2) a porcentagem de espermatozoides móveis (escala de 0 a 100%).

As análises foram realizadas sobre cada um dos ejaculados, a cada dia de conservação do sêmen e dentro de cada tratamento até D6 (dia 6), sendo J0, o dia da coleta. As observações foram realizadas após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C. Esse período de incubação foi escolhido, tomando-se como hipótese, que quando da inseminação artificial, o sêmen chega a essa temperatura o mais tarde, 5 minutos após sua deposição no trato genital feminino, bem como os espermatozoides migram até as trompas uterinas, dentro de um período em torno de 3 horas.

Para as inseminações artificiais, as doses de sêmen, são preparadas e estocadas no Laboratório de Reprodução Suína (SEIA, Rouillé). Após sua diluição, as doses de sêmen (90mL) são conservadas a uma temperatura de 15 °C.

02. Teste de Termorresistência

O teste de termorresistência, consiste em uma incubação do sêmen após sua diluição, e manutenção do mesmo em banho maria a 39 °C. A cada dia de conservação do sêmen, as características de vigor espermático das amostras foram analisadas após 5 minutos e 3 horas de incubação. Após cada incubação, uma gota de sêmen (15µL) era colocada entre lâmina e lamínula, visando sua observação ao microscópio óptico em contraste de fase (130x). As avaliações eram feitas “as cegas”, de forma que o observador ignore a identidade das amostras que eram apresentadas em códigos.

Antes de cada leitura, os tubos de ensaio, onde se encontram as amostras, são agitados, com a finalidade de homogeneizar a mistura diluente/sêmen. Para cada amostra, ao menos três campos de microscópio eram analisados com a finalidade de se avaliar a motilidade espermática.

2.1. Classificação do vigor espermático

Para o vigor, a análise é individual, e em cada campo de microscópio, são avaliadas umas cinquenta células escolhidas ao acaso. Essa classificação corresponde a um grupo de características para cada nota inteira. Os valores intermediários são dados quando as características espermáticas são intermediárias àquelas de duas notas inteiras consecutivas que a enquadram. As características utilizadas para a classificação do vigor espermático dos espermatozoides do varrão são as seguintes (Tabela 03):

Tabela 03: Classificação da motilidade individual dos espermatozoides do varrão, de acordo com o vigor espermático, o deslocamento e os tipos de movimentos.

Notas	Características da Classificação
0,0	Espermatozoides totalmente imóveis;
1,0	Deslocamento muito lento ou sem deslocamento; tremor do espermatozoide e fracas oscilações do flagelo de eficácia nula;
2,0	Deslocamento com movimentos circulares fracos e desorganizados com tremores sem sair do campo do microscópio; alguns espermatozoides se deslocam mais rapidamente. Oscilações fracas do flagelo;
3,0	Deslocamentos curvilíneos dos espermatozoides sem tremores e com um raio bem mais importante. Os espermatozoides começam a sair do campo do microscópio. Oscilações intensas do flagelo;
4,0	Deslocamento rápido de algumas células com uma trajetória retilínea. Trajetória circular de outros espermatozoides com saída do campo do microscópio. Oscilações fortes do flagelo;
5,0	Deslocamentos muito rápidos e retilíneos (flechante) dos espermatozoides que saem do campo do microscópio. Oscilações muito fortes do flagelo.

Notas	(A) Deslocamento	(B) Vigor	(C) Movimentos				
			Não Progressivo		Progressivo		
			Rotativo	Circular	Circular	Retilíneo	Flechante
0,0	-	-					
0,5	-	±	*				
1,0	±	+		*			
1,5	+	+		*			
2,0	++	+			*		
2,5	++	++			*		
3,0	+++	++			*	*	
3,5	+++	+++				*	
4,0	++++	+++				*	
4,5	++++	++++				*	*
5,0	+++++	++++				*	*

(A) Deslocamento	Presente (+), ausente (-), presente em um pequeno número de espermatozoides com ligeiro movimento (±). A classificação varia de 1 a 5 cruces, segundo a velocidade de deslocamento.
(B) Vigor	É a frequência de batimentos do flagelo, classificado de zero (-) a quatro cruces.
(C) Movimentos	A presença de um (*) indica o tipo de movimento efetuado pelo espermatozoide.

Tipos de Movimentos	
Rotativo	Movimentos de rotação sobre si mesmo, sem deslocamento.
Circular	Movimentos restritos a um círculo com raio pequeno (sem deslocamento) ou com raio grande (com deslocamento).
Retilíneo	Movimentos em linha reta.
Flechante	Movimentos em linha reta e rápidos.

(Fonte: TONIOLLI, 1996)

2.2. Classificação da motilidade espermática (% espermatozoides móveis)

Para a motilidade espermática, também conhecida por porcentagem de células móveis, a avaliação de cada campo de microscópio é global. Se considera para as análises o número de células móveis em relação ao número total de células de cada campo de microscópio analisado. Para o valor final da avaliação dessa característica, em porcentagem, deve-se levar em consideração as características celulares de motilidade predominantes, dentro de cada campo de microscópio visualizado. Devem ser analisados ao menos três campos, através da movimentação da lâmina feita com o *charriau* do microscópio.

03. Adição de substâncias ao sêmen diluído

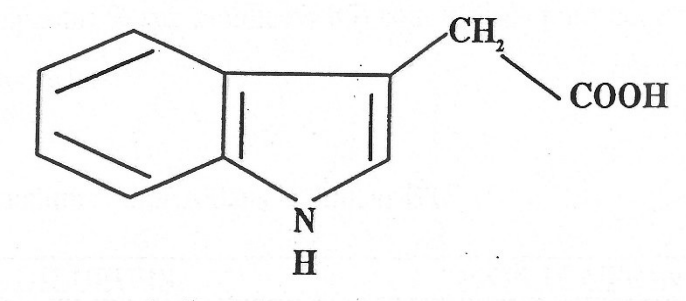
As diferentes substâncias testadas são adicionadas ao diluente BTS, antes da diluição do sêmen (ejaculado).

3.1. O ácido 3-indol acético (IAA)

3.1.1. A origem do IAA

A molécula do IAA, é utilizada nesse trabalho na sua forma sintética (Sociedade Andrich). Ela tem um peso molecular de 175 e sua fórmula química é a seguinte (Figura 01):

Figura 01: Estrutura química da molécula do ácido 3-indol acético.



(Fonte: THIMANN, 1936)

3.1.2. Concentração do IAA

Em um primeiro momento, serão utilizadas duas concentrações diferentes do IAA, a fim de uma comparação dos resultados. As concentrações finais utilizadas foram as seguintes: 10ng/mL ($5,7 \times 10^{-8}$ M) e 100ng/mL ($5,7 \times 10^{-7}$ M). Uma solução mãe de IAA (1mg/mL) em etanol, é utilizada para a preparação das soluções diluídas no BTS (diluente controle). Dessa forma, a concentração final do etanol não passará de a/10.000 v/v. A solução mãe é conservada a -20°C e no escuro, no máximo por 30 dias, uma vez que não foi estudada sua estabilidade após um mês de conservação dessa forma. Para esse experimento, um total de 59 machos e 109 ejaculados (valores médios: volume = 313mL; concentração = 335×10^6 spz/mL; porcentagem de células móveis = 85%), foram utilizados.

3.2. Cloreto de cálcio (CaCl₂)

Foi testado o efeito do cálcio sobre a conservação *in vitro* do sêmen do varrão a 15 °C durante um período de 6 dias. O sal de cloreto foi escolhido devido ao fato de que nessa forma o cálcio apresenta uma boa estabilidade e não precipita dentro do meio diluente. O sêmen de 15 machos (1 ejaculado/macho) foi coletado e diluído no BTS, adicionado ou não do cálcio. Os ejaculados apresentaram os seguintes valores médios: volume = 295mL; concentração = 280×10^6 sptz/mL; porcentagem de espermatozoides móveis = 85%. O diluente BTS, sem a adição do cálcio, serviu de tratamento controle. Um total de quatro diferentes concentrações de cálcio foram estudadas: 01) 0,014mM; 02) 0,41mM; 03) 4,1mM e 04) 41mM.

3.3. Ação do cálcio sobre os espermatozoides

A concentração de 4,1mM foi escolhida para ser utilizada na sequência do trabalho, pelo fato de que, nos testes preliminares, foi nessa concentração de cálcio adicionada ao diluente BTS, que se conseguiu os melhores resultados da motilidade espermática. Para os testes da interação IAA/Ca⁺⁺, o IAA foi testado na concentração final de 100ng/mL dentro do diluente BTS. Um total de 15 reprodutores (1 ejaculado / macho) com os seguintes valores médios: volume = 333mL; concentração = 343×10^6 sptz/mL; porcentagem de espermatozoides móveis = 85%, foram utilizados nesse experimento, no qual foi constituído 4 tratamentos (Tabela 04):

Tabela 04: Adição de cálcio e de IAA no diluente BTS.

Lotes	Diluentes	Explicação
1	BTS	Tratamento controle de referência
2	BTS + IAA (100ng/mL)	Adição do IAA a 100ng/mL
3	BTS + Ca ⁺⁺	Lote 1 adicionado de cálcio a 4,1mM
4	BTS + Ca ⁺⁺ + IAA (100ng/mL)	Lote 2 adicionado de cálcio a 4,1mM

04. Plasma Seminal

Foi estudado *in vitro* o efeito da concentração do plasma seminal sobre a conservação do sêmen do varrão, a volume constante, conservado a 15 °C durante 6 dias (D0 a D6).

Após a coleta do sêmen, o plasma seminal de cada ejaculado é substituído por um certo volume de uma mistura (*pool*) de plasmas seminais, provenientes de outros reprodutores não participantes desse trabalho de pesquisa e em seguida diluído em BTS. Essa prática, permiti distinguir o efeito do plasma seminal de um eventual efeito individual.

4.1. Utilização do plasma seminal em diferentes concentrações

Um total de 20 varrões foram utilizados para esse trabalho (1 ejaculado/macho – valores médios: volume = 297mL; concentração = 340×10^6 sptz/mL; porcentagem de espermatozoides móveis = 85%). O objetivo foi de verificar a qual

concentração de plasma seminal, são obtidos os melhores resultados de motilidade espermática. O volume total de cada lote, foi repartido em alíquotas de 3mL (35×10^6 sptz/mL), conservadas à temperatura de 15 °C, de forma a poderem ser observadas e avaliadas até o sexto dia de conservação do ejaculado.

A cada dia, até D6, um tubo de cada lote (tratamento), é colocado em bando maria a 39 °C, visando a avaliação dos parâmetros de motilidade espermática. Os tubos são agrupados a cada 5 por vez, dentro do banho maria, para permitir uma diferença de no máximo 5 minutos entre cada leitura e avaliação. Foram assim preparados 6 lotes por ejaculado com concentrações diferentes de plasma seminal (Tabela 05):

Tabela 05: Formação dos lotes (tratamentos) de acordo com as diferentes concentrações do plasma seminal a uma concentração fixa de 35×10^6 sptz/mL.

Lotes	Volume BTS (mL)	Volume Plasma Seminal (mL)	Concentração do Plasma Seminal
1	12,25	12,25	1/2
2	19,60	4,90	1/5
3	22,05	2,45	1/10
4	23,27	1,23	1/20
5	23,69	0,81	1/30
6	24,26	0,24	1/100

4.2. Ação do plasma seminal (PS)

Apoiado na base da experimentação precedente, a concentração do plasma seminal a 1/10 dentro do diluente BTS, foi escolhida por ter sido comparada a três lotes formados com a seguinte conformação:

- 01 = Sêmen puro, reconstituído pela adição do plasma seminal em quantidade que recompõe o volume de origem;
- 02 = BTS sem plasma seminal;
- 03 = BTS + IAA (100ng/mL) sem plasma seminal.

Para esse experimento, 34 machos e 48 ejaculados (valores médios: volume = 292mL; concentração = 340×10^6 sptz/mL; porcentagem de espermatozoides móveis = 85%) foram utilizados. Os diferentes lotes (tratamentos) foram formados segundo o esquema a seguir na Tabela 06.

A diluição do PS escolhida foi a de 1/10, pelas razões seguintes:

- 01. Os resultados obtidos com essa diluição, não diferiram significativamente dos observados com as diluições 1/5 e 1/20 (veja resultados 1.3.1; Figura 06 – estudo prévio);
- 02. Essa diluição é a mais frequente em um Centro de produção de sêmen, para se obter a concentração final desejada de espermatozoides;
- 03. Pela facilidade prática de manipulação.

Tabela 06: Formação dos diferentes lotes (tratamentos) de acordo com o efeito do plasma seminal (1/10) a uma concentração fixa de 35×10^6 sptz/mL.

Lotes	Diluentes	Concentração do Plasma Seminal	Volume Diluente (mL)	Volume Plasma Seminal (mL)
1	Sêmen puro	Puro	-*	24,5
2	BTS	Sem PS	24,5	-*
3	BTS + IAA	Sem PS	24,5	-*
4	BTS + P.S.	1/10	22,05	2,45

4.3. Ação de proteínas de origens diversas

A ação específica do plasma seminal sobre a motilidade espermática foi verificada através da substituição por outras proteínas. Com essa finalidade, o ejaculado de 13 reprodutores (1 ejaculado/macho; valores médios: volume = 282mL; concentração = 334×10^6 sptz/mL; porcentagem de espermatozoides móveis = 85%) foi centrifugado. Após a retirada do sobrenadante, as proteínas adicionadas ao diluente BTS, são misturados à papa de espermatozoides no lugar do plasma seminal. Três proteínas diferentes foram utilizadas:

01. A albumina sérica bovina (BSA);
02. O leite desnatado de vaca (muito utilizado para conservação de espermatozoides de outras espécies animais);
03. A transferrina extraída do soro ovino (Tf) (marcador da função sertoliana).

O lote (tratamento) controle foi formado pelo plasma seminal diluído a 1/10 no diluente BTS. Todos os lotes tinham a mesma concentração de proteínas e foram formados segundo o esquema abaixo (Tabela 07):

Tabela 07: Diferentes tipos de proteínas (1/10) visando verificar seus efeitos sobre o espermatozoide supino, com o sêmen a uma concentração fixa de 35×10^6 sptz/mL.

Lotes	Proteínas	Volume Diluente (mL)	Volume proteína (mL)	Concentração da Proteína
1	P.S.	22,05	2,45	1/10
2	BSA	22,05	2,45	1/10
3	Lait	22,05	2,45	1/10
4	Tf	22,05	2,45	1/10

4.4. Frações ativas do plasma seminal

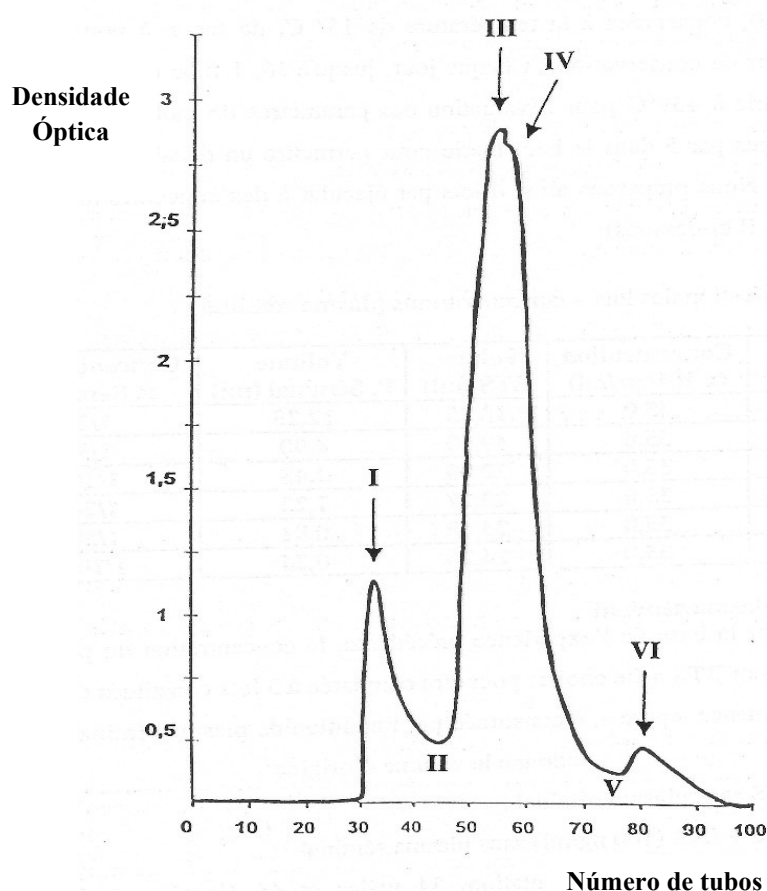
4.4.1. Extração das frações ativas

Doze mililitros de plasma seminal foram centrifugados (5000rpm, durante 30 segundos), com a finalidade de se eliminar as suspensões celulares restantes. Uma

separação das frações (Figura 02), para verificar a presença de uma possível ação de cada uma delas sobre a motilidade dos espermatozoides, foi realizada por uma passagem do plasma seminal por uma coluna de 85 x 2,5cm de *Sefacryl S-200* (Pharmacia).

Figura 02: Extração das frações ativas do plasma seminal.

Frações	Tubos
I	34 a 39
II	40 a 49
III	50 a 55
IV	56 a 63
V	64 a 77
VI	78 a 84



O bicarbonato de amônio (50mM, pH 8,1) foi utilizado como um eluente e o débito de filtração foi de 5mL/cm² (25mL/hora). O eluente foi recuperado pela fração de 5,8mL.

4.4.2. Formação dos lotes (tratamentos)

A Figura 02 mostra o perfil de eluição do plasma seminal sobre a coluna de *Sephacryl*. As seis frações numeradas de I a VI, foram coletadas, entretanto, somente aquelas correspondentes aos picos foram consideradas para o trabalho (I, PM $\geq$ 100.000; III e IV, PM = entre 40.000 e 70.000; VI, PM $\geq$ 5.000), com a finalidade de serem testadas.

O volume de cada uma dessas frações foi de em torno de 30mL. Assim sendo, se o produto ativo presente nos 12mL iniciais do plasma se encontrar dentro de alguma dessas frações, ele será diluído 2,5 vezes em relação ao início. Por conta disso, cada fração foi diluída quatro vezes para poder ser comparada ao plasma seminal diluído 10 vezes.

No presente estudo, 5 machos foram coletados (1 ejaculado/macho; valores médios: volume = 305mL; concentração = 370×10^6 sptz/mL; porcentagem de espermatozoides móveis = 85%). Os lotes experimentais foram assim formados, e apresentados na Tabela 08 abaixo:

Tabela 08: Diferentes tratamentos visando testar as frações ativas do plasma seminal com o sêmen a uma concentração fixa de 35×10^6 sptz/mL.

Lotes	Proteínas	Volume BTS (mL)	Volume Frações (mL)	Concentração Plasma Seminal e Frações
1	P.S.	21,6	2,4	1/10
2	Fração I	18,0	6,0	1/4
3	Fração III	18,0	6,0	1/4
4	Fração IV	18,0	6,0	1/4
5	Fração VI	18,0	6,0	1/4

05. Morfologia dos espermatozoides

Com relação a análise morfológica, os esfregaços espermáticos foram feitos todos os dias após 5 minutos de aquecimento das amostras (codificadas) a 39 °C. As amostras foram coradas com vermelho congo segundo a técnica de Kovacs et Foote (1992). Essa técnica se baseia no princípio de permeabilidade da membrana do espermatozoide. Uma vez que a integridade da membrana não pode ser mais assegurada, o corante penetra na cabeça do espermatozoide que fica mais ou menos colorida. A coloração das partes anteriores e posteriores da cabeça e o aspecto do cromossoma são levados em consideração. As observações são feitas à luz da microscopia óptica no aumento de 800x, analisando-se um total de 300 células por lâmina. As diferentes categorias são classificadas conforme colocado na Tabela 09:

Tabela 09: Classificação do espermatozoide como vivo/morto e acrossoma normal/danificado, segundo coloração com vermelho congo da cabeça espermática.

Categoria Sptz	Acrossoma	Cabeça	Coloração
Vivos	Normal	Anterior	Violeta
		Posterior	Branco / Rosa claro
	Danificado	Anterior Posterior	Azul claro / escuro, cinza claro Branco / Rosa claro
Mortos	Normal / Danificado	Posterior	Preto ou cinza escuro

5.1. Análise morfológica

Um total de 45 machos (1 ejaculado/macho) foram utilizados para essas análises. Após a coleta, cada ejaculado foi dividido a fim de que uma fração fosse diluída dentro de cada diluente testado, formando um total de três lotes de tratamentos conforme colocado abaixo:

- 01. Tratamento 01 = BTS;
- 02. Tratamento 02 = BTS + IAA a 10ng/mL (10);
- 03. Tratamento 03 = BTS + IAA a 100ng/mL (100).

Cada fração foi repartida em alíquotas de 3,0mL e em seguida estocadas à temperatura de 15 °C até os momentos de observação (análise) que serão feitas nos seguintes dias: o primeiro em D1; o quinto em D5 e o décimo terceiro em D13, após o início da experimentação. O efeito dos tratamentos será apreciado pela avaliação da morfologia avaliada nas amostras de 30mL de cada um dos ejaculados, nos três momentos estipulados acima e para cada um dos tratamentos (BTS e BTS + IAA). O dia de coleta do sêmen foi considerado como o D0.

06. Análise Estatística

Os resultados de fertilidade e de prolificidade foram apresentados sob a forma de tabelas e analisados por comparação de distribuição de frequências (Teste de Students e Teste do X^2 corrigido).

Os resultados foram expressos pelas médias e desvio padrão para cada tratamento. As análises das diferenças entre as médias foram feitas através de análise de variância multifatorial no experimento in vitro com a ajuda do programa de computação SYSTAT (versão – 1994).

A análise de variância foi determinada pela seguinte equação:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jl} + (\alpha\beta\delta)_{ijk} + E_{ijkl} (n;o;\sigma^2)$$

Y = variável

μ = média geral

α = efeito diluente

β = efeito dia de conservação

δ = efeito tempo de incubação

σ^2 = variância residual

II. 2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM O SÊMEN REFRIGERADO

01. Diluentes e formação dos lotes (tratamentos)

Os ejaculados foram repartidos em doses para serem utilizados segundo a técnica dos “ejaculados divididos” dentro de cada tratamento. Os diluentes testados foram o BTS (controle) e o BTS adicionado do IAA na concentração final de 10ng/mL. As fêmeas utilizadas nesse experimento foram majoritariamente múltiparas (com 8,5% de

nulíparas), divididas de forma equilibrada dentro dos 5 lotes de tratamento. O esquema de formação dos lotes de inseminação está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Lotes de inseminação artificial, sêmen refrigerado, de acordo com o diluente, dia / dose de IA e número de espermatozoides.

Lotes	Diluente	Dias de IA	Dose de IA / Volume	Nº de Sptz
1	BTS	D0 e D1	Simples / 90mL	3×10^9 sptz/IA
2	BTS + IAA	D0 e D1	Simples / 90mL	3×10^9 sptz/IA
3	BTS + IAA	D5 e D6	Simples / 90mL	3×10^9 sptz/IA
4	BTS + IAA	D5 e D6	Dupla / 90mL	6×10^9 sptz/IA
5	BTS	D5 e D6	Dupla / 90mL	6×10^9 sptz/IA

02. Aplicação das doses de sêmen (IA)

Foram realizadas duas inseminações por cio, à razão de uma concentração espermática de 3×10^9 sptz ou a 6×10^9 sptz cada uma, com um intervalo de 24 horas, sendo o primeiro dia de inseminação, D0 e D5 e o segundo, foi o dia seguinte, D1 e D6. O dia da coleta do sêmen, foi considerado o D0. Uma bisnaga plástica com capacidade para 90mL (35×10^6 sptz/mL) foi utilizada para as inseminações simples e duas bisnagas para as com dose dupla. Os parâmetros de fertilidade foram expressos pela porcentagem de partos e a prolificidade pelo número total de leitões nascidos por barrigada, bem como pelo número de leitões nascidos vivos.

03. Pesquisa de cio

A detecção de cio das fêmeas foi feita com a ajuda de um macho bem como pelo teste da monta feita na fêmea pelo tratador (homem). Esses dois procedimentos (controle de cio) eram feitos duas vezes por dia, sendo uma de manhã cedo e a outra na parte da tarde após as 16 horas. Todos os controles foram registrados, visando o cálculo da duração do estro. Visando a utilização do sêmen congelado, a detecção do cio das fêmeas foi feita três vezes por dia, em horários precisos: 7 horas, 12 horas e 18 horas. Os controles foram feitos todos os dias da semana, e parados (o mais breve possível) após duas observações negativas, indicando o fim do cio. Todos os controles foram registrados visando o cálculo da duração do cio. As observações de cio foram feitas baseadas nas seguintes características (Tabela 11).

Tabela 11: Características consideradas, nas marrãs para a avaliação da pesquisa de cio.

Positiva (+)	A fêmea apresentava sinais externos evidentes de cio: orelhas voltadas para trás; vulva edemaciada; tentava montar em outra porca ou imóvel na presença de um macho bem como quando montada pelo tratador.
Duvidosa (±)	A fêmea apresenta sinais externos de cio, entretanto se locomove e não aceita a presença e intervenção do macho e do tratador.
Negativa (-)	A fêmea não apresenta nenhum sintoma externo de cio, refuga e foge sistematicamente da aproximação do macho ou do tratador.

III. RESULTADOS

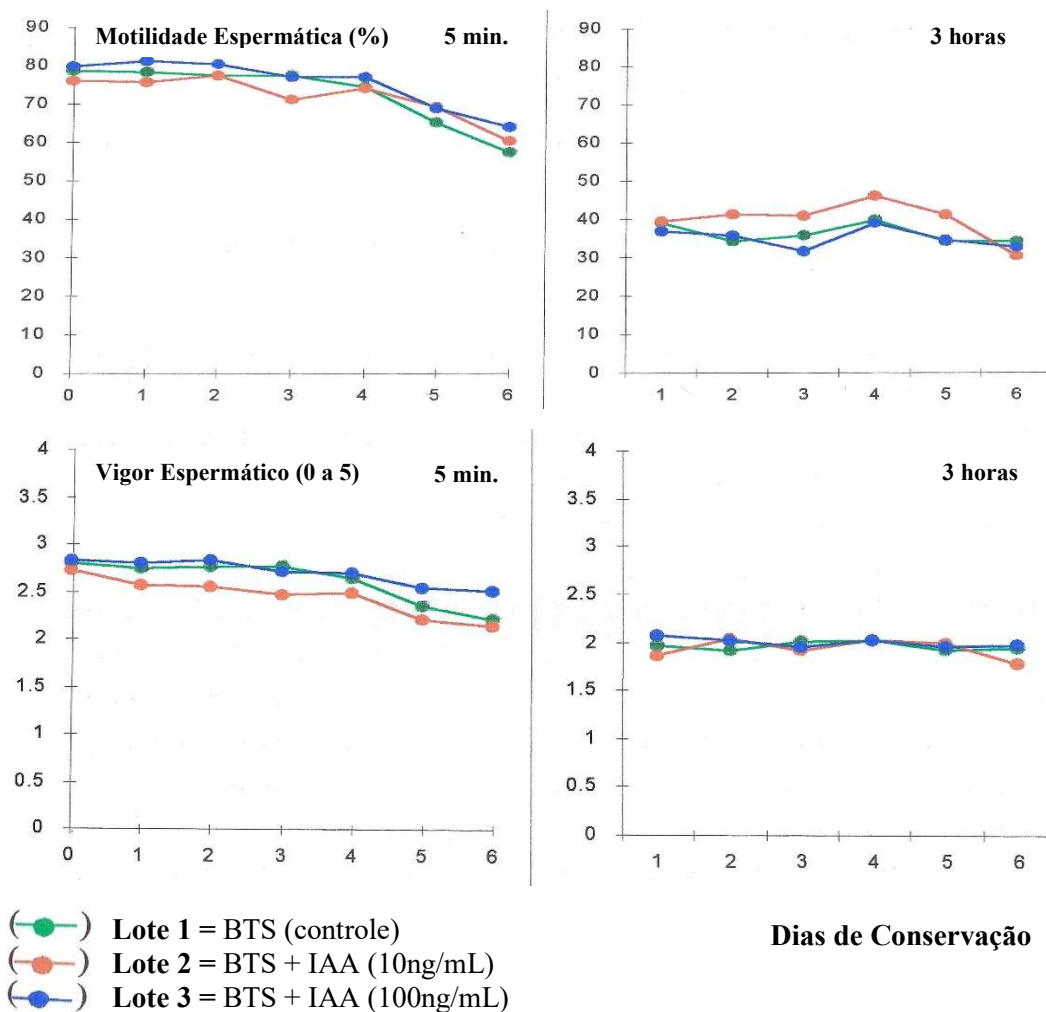
III. 1. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN REFRIGERADO: ESTUDO *IN VITRO*

01. Mobilidade espermática: vigor e motilidade espermática

1.1. Ação do IAA

O IAA nas concentrações de 10 e 100ng/mL não apresentou nenhum efeito significativo ($p>0,05$) sobre o vigor e a motilidade espermática durante os 6 dias de conservação do sêmen a 15 °C (Figura 03). Durante a estocagem do ejaculado em um período de 5 a 6 dias, os parâmetros de mobilidade espermática entre D0 e D6, a 5 minutos de incubação, apresentaram um fraco decréscimo, com a presença ou não do IAA dentro do diluente BTS. Esse efeito não significativo, foi visto nas duas características estudadas.

Figura 03: Efeito do ácido 3-indol acético (IAA) durante um período de conservação de 6 dias, sobre as características da mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.



Até D4, a motilidade espermática após 5 minutos de incubação a 39 °C, variou entre 70 e 80%, com um vigor com valores entre 2,5 e 3,0. Nos dias 5 e 6 de conservação, uma queda dos dois parâmetros avaliados foi observada, até valores de 50 e 60% (motilidade) e 2,0 a 2,5 (vigor).

Os resultados obtidos com a concentração de 100ng/mL de IAA adicionada ao diluente BTS, apresentaram na média uma ligeira superioridade (não significativa) para os dois parâmetros estudados, aos 5 minutos de incubação.

Com relação a porcentagem de espermatozoides móveis (motilidade), a dose de IAA a 10ng/mL apresentou valores médios superiores em relação aos resultados com a utilização do BTS sozinho (controle), bem como aos resultados com o IAA a 100ng/mL, mas somente após 3 horas de incubação e até o quinto dia (D0) de conservação do ejaculado. Entretanto, essas diferenças, não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

1.2. Ação do cálcio (CaCl_2)

A ação do cálcio sobre a mobilidade espermática foi testada, em um primeiro momento, estudando-se os efeitos de diferentes concentrações do CaCl_2 . Em seguida, apenas uma concentração foi utilizada, aquela que apresentou os resultados mais favoráveis durante a pré-experimentação, para ser adicionada ao BTS e ao BTS + IAA, na sequência do trabalho.

1.2.1. Efeito das concentrações crescentes de CaCl_2

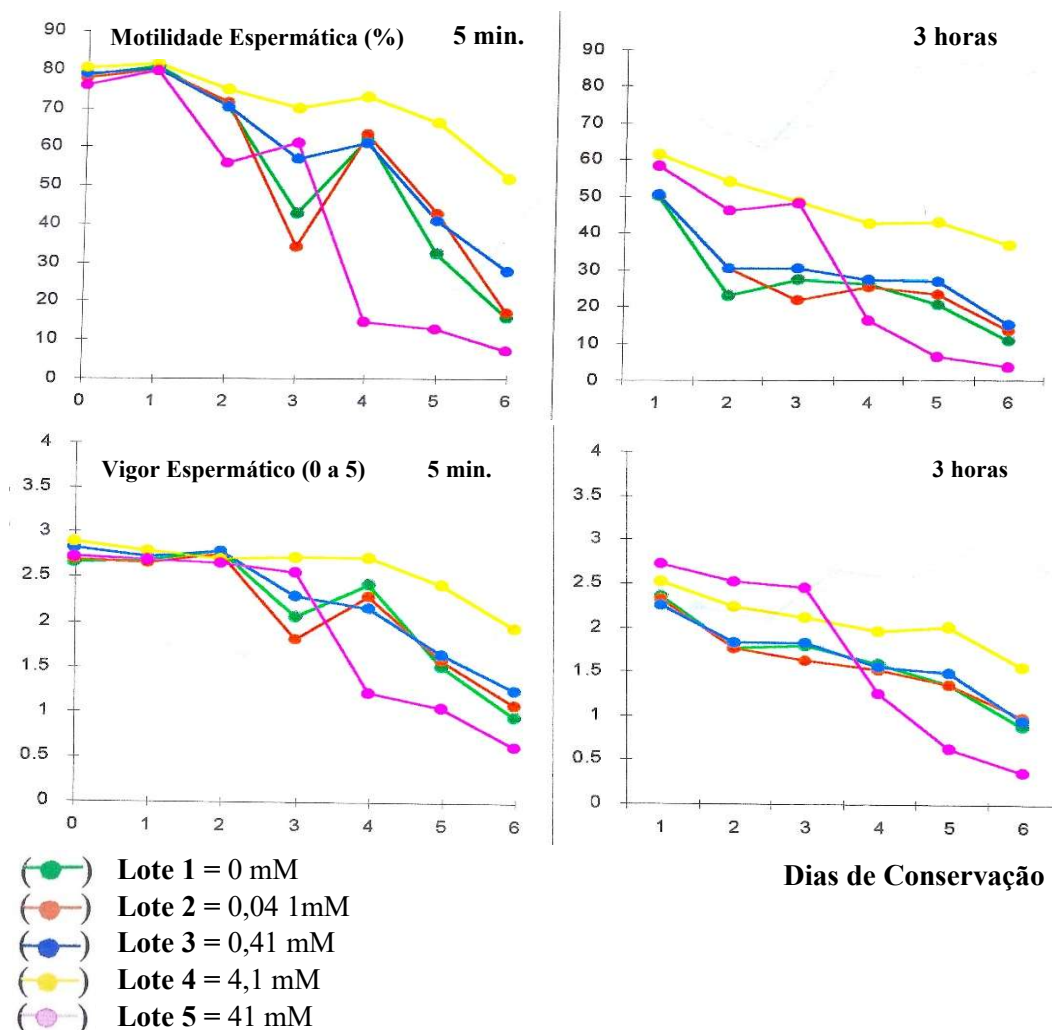
Exceto para a motilidade a 3 horas de incubação, entre D0 e D3, os efeitos mais evidentes sobre a mobilidade espermática, foram observados quando utilizado o cálcio na concentração de 4,1mM. As diferenças entre os tratamentos e entre os dias de conservação foram muito significativas ($p=10^{-3}$).

Aos cinco minutos de incubação e para as duas características analisadas (vigor e motilidade), os valores entre os diferentes tratamentos ficaram próximos até o segundo dia de conservação (D2). Após 3 horas de incubação, dentro do mesmo período (D1 a D3), as concentrações de CaCl_2 a 4,1 e 41mM, apresentaram resultados para essas duas características superiores aos encontrados nas outras concentrações. A partir de D4, as diferenças foram mais importantes com um efeito significativamente favorável à concentração de 4,1mM.

Por outro lado, se a concentração de 41mM parece às vezes apresentar resultados superiores aos obtidos com 4mM, isso é verdadeiro até o terceiro dia de conservação, uma vez que a partir do quarto dia (D4), uma forte queda das características espermáticas é observada: mais de 80% dos espermatozoides não estão mais móveis (Figura 04).

Os resultados da análise de variância mostraram que, respectivamente 46 a 51% das variações totais do vigor e da motilidade espermática, foram explicadas pelos efeitos do diluente, do dia, da incubação e as interações duplas e triplas. O restante, 54 a 49% foram devidos a fatores não controlados no experimento.

Figura 04: Efeito da concentração de cálcio (CaCl_2) adicionado ao diluente BTS, sobre as características da mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.



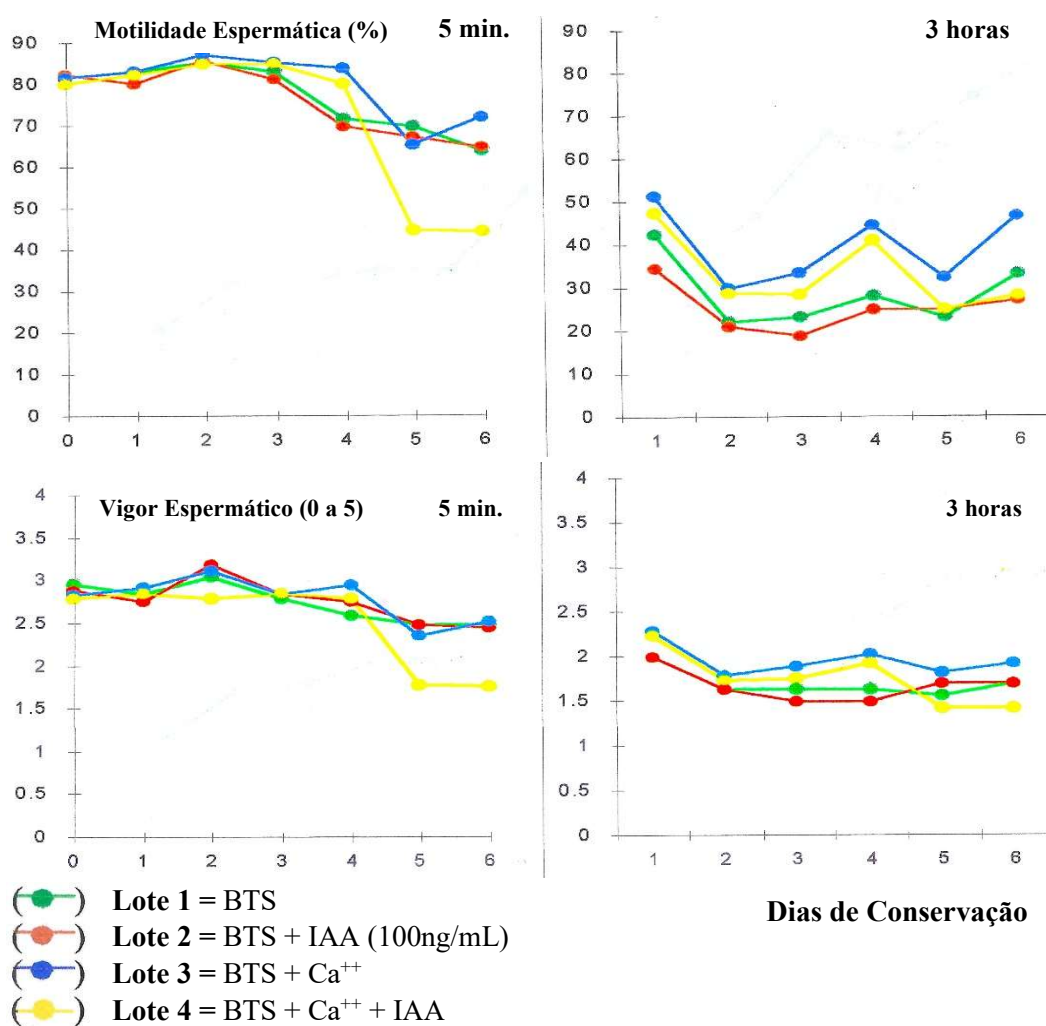
1.2.2. Interação do IAA com o CaCl_2

Nesse experimento, a adição do cálcio a concentração de 4,1mM no meio de conservação (diluente), não pareceu estimular as características de mobilidade espermática, exceto para a porcentagem de móveis após 3 horas de incubação. Aos 5 minutos de incubação, os valores do vigor e da motilidade, com ou sem a adição do cálcio, ficaram muito próximos durante todo o período de conservação do sêmen. Globalmente os valores de mobilidade com o diluente BTS na presença do cálcio ficaram acima dos resultados do tratamento controle.

Interessante a se dizer que, após 4 dias, em qualquer tempo de incubação, as características espermáticas diminuíram quando o cloreto de cálcio e o IAA se encontravam juntos dentro do diluente. Esta afirmativa se apresentou significativa aos cinco minutos, mas não após 3 horas de incubação: a porcentagem de espermatozoides móveis caiu de 80 para 40% e o vigor espermático de 3,0 para 2,0 ($p < 0,05$). Após 3 horas de incubação e em particular para a motilidade espermática, os diluentes em presença de cálcio pareciam guardar um maior número de células móveis em melhores condições. A

queda dos valores na ausência do cálcio foi significativamente mais importante ($p < 0,05$). Na característica vigor espermático, foi reparada uma mesma tendência, mas com diferenças mais fracas e não significativas nos resultados entre os diluentes com e sem cálcio (Figura 05).

Figura 05: Efeito da adição do cálcio (CaCl_2) na concentração de 4,1mM, aos diluentes BTS e BTS + IAA (100ng/mL), sobre as características da mobilidade espermática após 5 minutos e 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.



1.3. Efeito do plasma seminal

A influência de diferentes concentrações de plasma seminal, foram testadas sobre as características de mobilidade espermática. Para se confirmar uma ação específica do plasma seminal sobre os espermatozoides, este é substituído por proteínas estranhas ou por suas próprias frações ativas, no meio de preservação do sêmen.

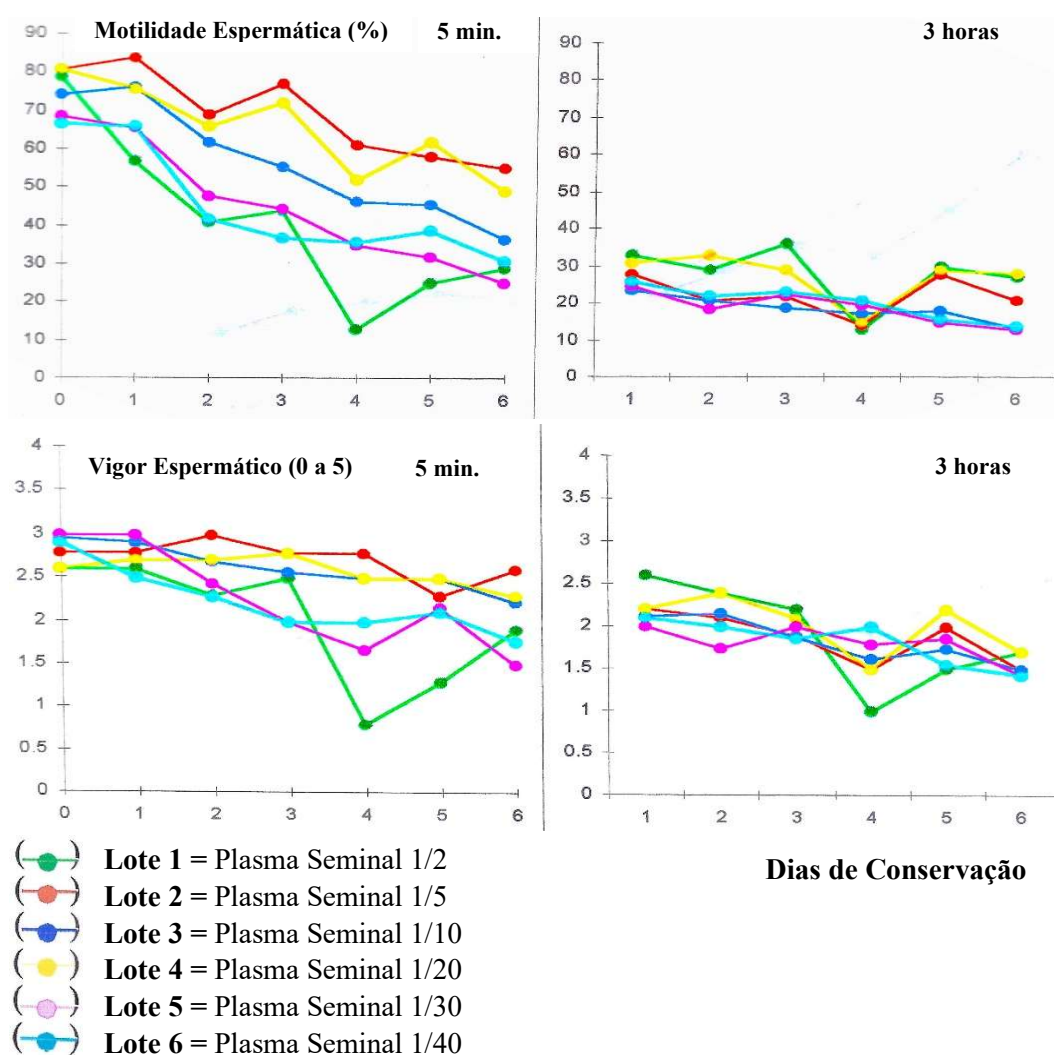
1.3.1. Ação do plasma seminal em diferentes concentrações

Após 5 minutos de incubação, os efeitos mais estimulantes do plasma seminal foram observados sobre o vigor e a motilidade espermática nas concentrações de 1/5, 1/10 e 1/20. Comparado com as outras três concentrações (1/2, 1/30 e 1/100), as diferenças

foram muito significativas ($p=10^{-3}$). Entretanto, nenhuma diferença entre as três primeiras concentrações, as mais estimulantes, foi observada nesse tempo de conservação de 5 minutos ($p>0,05$).

Após as 3 horas de incubação, nenhuma diferença foi observada, nas duas características de mobilidade espermática analisadas ($p>0,05$). Essa afirmativa se expressa pela superposição das curvas (Figura 06). Entretanto, pode-se também notar que, para a concentração do plasma seminal a 1/2, uma queda importante foi vista em D4, que ainda resta inexplicada: talvez tenha sido devido a um artefato de técnica.

Figura 06: Influência da taxa de diluição do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, do sêmen do varrão diluído no diluente BTS, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C.

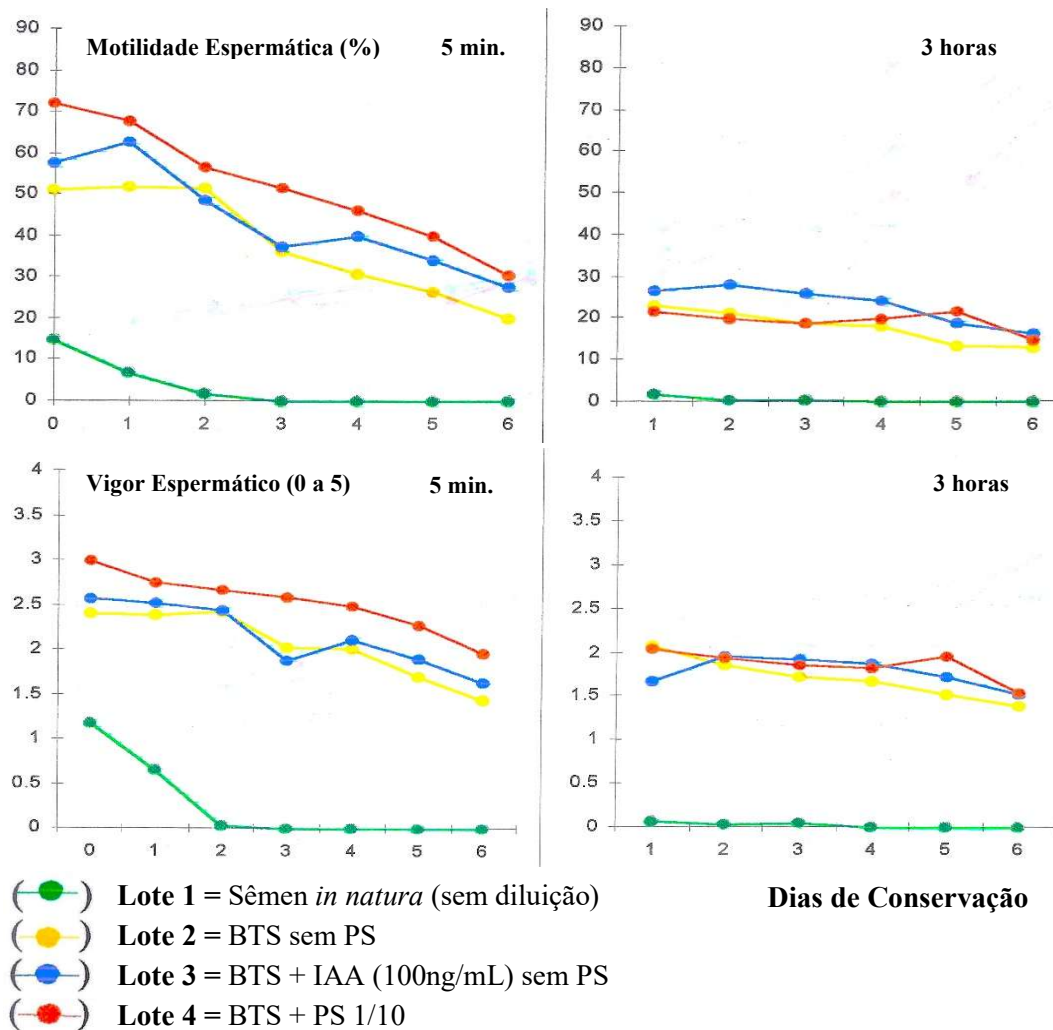


1.3.2. Interação do IAA com o diluente

Nas amostras onde o sêmen *in natura* foi guardado na completa ausência de um diluente (Lote 1), somente algumas células vivas foram ainda observadas no segundo dia de conservação. O desenvolvimento de bactérias no meio foi observado e pode ser explicado pela ausência de antibióticos no sêmen. Isso foi particularmente observado

quando comparado com os outros lotes contendo no meio a presença de antibióticos (normalmente presente na constituição do BTS). As diferenças encontradas entre as características da mobilidade espermática foram muito significativas ($p=10^{-3}$) (Figura 07).

Figura 07: Efeito do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C, com sêmen diluído no diluente BTS adicionado ou não de IAA à concentração de 100ng/mL.



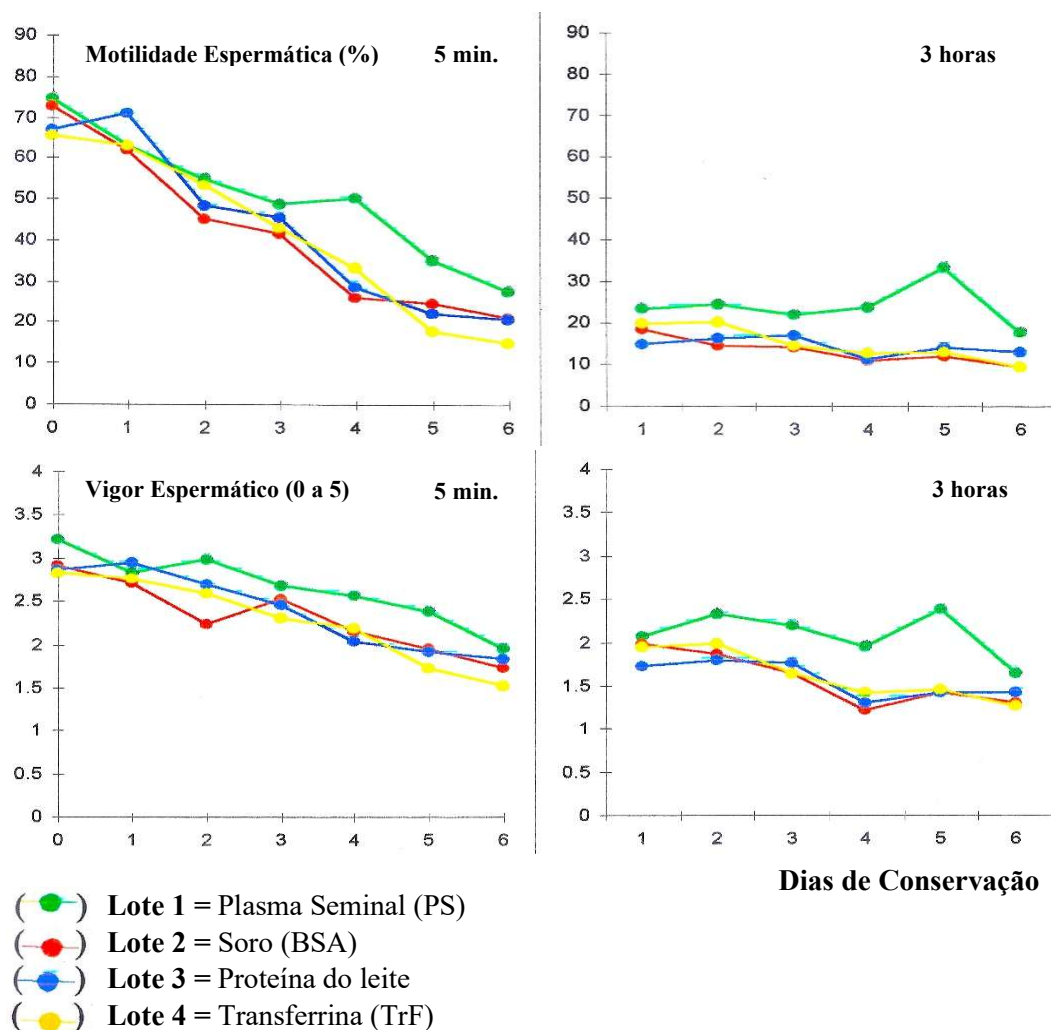
Na ausência do plasma seminal no meio diluente (Lote 2), os níveis de avaliação das características de mobilidade foram superiores aos obtidos no lote 1, entretanto, não alcançaram os valores dos resultados no lote 4, no qual o plasma seminal está presente, em uma concentração de 1/10 ($p>0,05$). Após 3 horas de incubação, a adição do IAA no diluente BTS, na ausência de plasma seminal (Lote 3), melhorou ligeiramente os resultados médio, quando comparados com os obtidos com o uso do BTS apenas. Entretanto, as diferenças não foram significativas ($p>0,05$). A adição de plasma seminal ao diluente BTS, com ou sem o IAA, manteve a mobilidade espermática nos melhores níveis após 5 minutos de incubação ($p<0,05$). Esse efeito desaparece após 3 horas de incubação do sêmen.

Após o período de incubação de 3 horas, as diferenças entre os valores dos resultados entre os lotes 2, 3, e 4, para a característica vigor espermático, ou para a porcentagem de espermatozoides móveis (motilidade), não foram mais significativas ($p>0,05$).

1.3.3. Ação de proteínas de origens diversas

Aparentemente a ação do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, apresentou um caráter específico. De fato, pode ser visto que a adição de proteínas estranhas, na mesma concentração, ao diluente BTS, leite desnatado e transferrina ovina, em substituição ao plasma seminal não melhorou os resultados da mobilidade espermática (Figura 08). A análise de variância mostrou que as diferenças entre diluentes foram muito significativas ($p=10^{-3}$). Nos lotes nos quais havia o plasma seminal, os resultados médios foram sempre mais elevados, em particular após as 3 horas de incubação do sêmen a 39 °C.

Figura 08: Efeito de proteínas de origens diversas sobre as características de mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C, com sêmen diluído no diluente BTS.

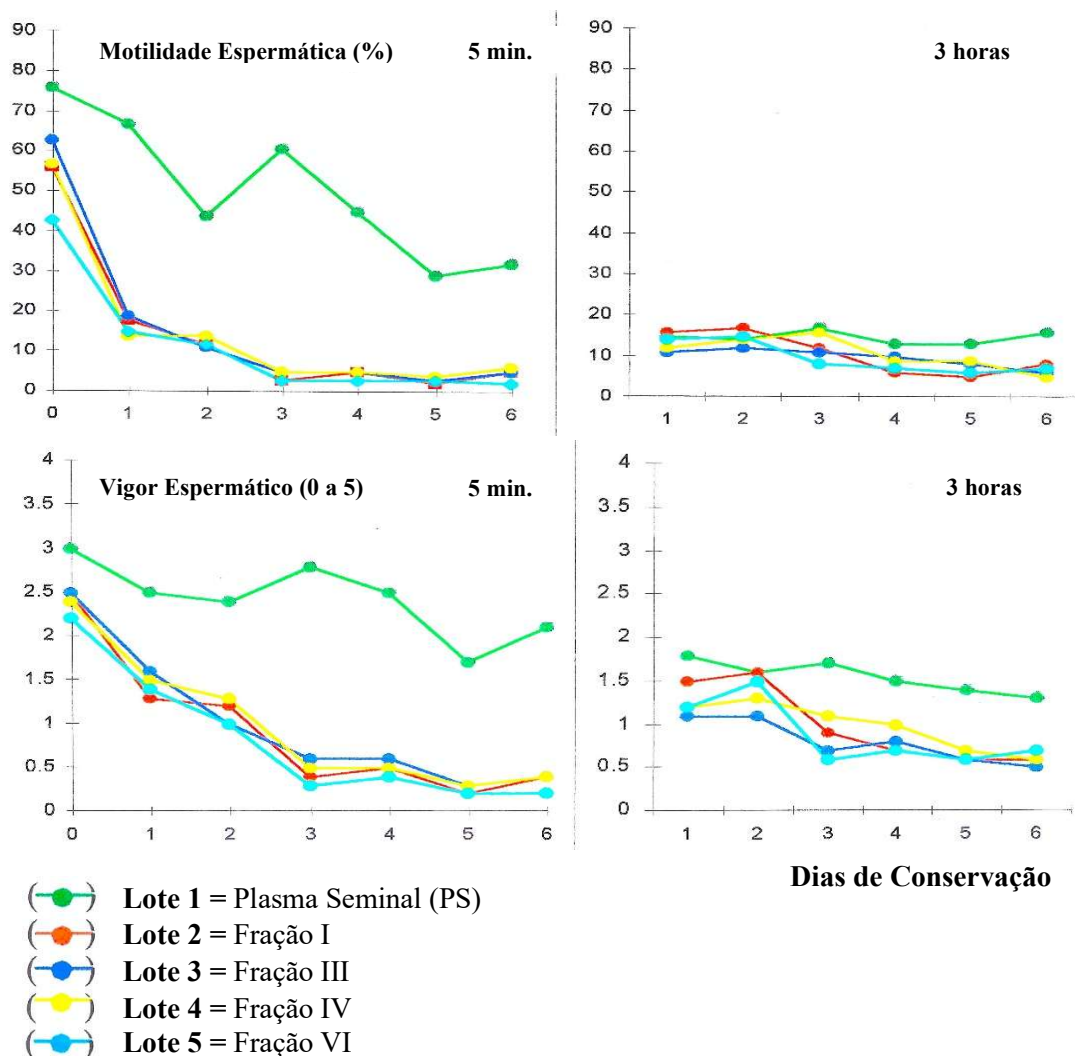


1.3.4. Ação das frações do plasma seminal

A ação das frações individuais do plasma seminal foi inferior à do plasma seminal inteiro (Figura 09). De fato, aos 5 minutos de incubação do sêmen no plasma seminal inteiro, a curva de porcentagem de espermatozoides móveis sofre uma queda progressiva de 75 a em torno de 30% entre D0 e D6.

No caso das frações, a queda da porcentagem de espermatozoides móveis foi mais rápida e, desde o segundo dia de conservação (D1) a porcentagem chegou a valores de 10 a 15%, enquanto no D0 ela apresentava valores entre 45 a 60%. Então esse nível desce progressivamente até atingir 5% no D6.

Figura 09: Efeito das frações ativas do plasma seminal sobre as características de mobilidade espermática, após 5 minutos e 3 horas de incubação a 39 °C, com sêmen diluído no diluente BTS.



Com relação ao vigor espermático aos 5 minutos, os perfis foram semelhantes, os níveis de queda muito mais rápidos nas frações individuais: 2,5 (D0) a 0,5 (D3) enquanto o vigor espermático no plasma seminal inteiro sofreu uma queda de 3,0 para 2,0, entre D0 e D6. As diferenças foram muito significativas ($p=10^{-3}$) durante todo o período de conservação do sêmen.

Após 3 horas de incubação, as diferenças entre os quatro lotes de tratamentos, e o lote controle, não eram mais significativas. Entretanto, os valores médios obtidos no plasma inteiro foram sempre mais elevados. Foi visto igualmente que os valores, desde o primeiro dia (D1) foram fracos: 10 a 15% de espermatozoides móveis e 1,2 a 1,8 para o vigor espermático.

02. Morfologia Espermática

2.1. Efeito da duração de conservação do sêmen

De uma forma geral, cada concentração do IAA adicionada ao diluente BTS, parece induzir os mesmos efeitos para cada dia de análises e conservação do sêmen (D1, D5 e D13) (Tabela 12).

Tabela 12: Influência da adição do IAA (10 e 100ng/mL), sobre as características morfológicas do espermatozoide do varrão, segundo o dia de conservação do sêmen (D1, D5, D13) a 15 °C.

Dias	D1			D5			D13		
Diluentes	[0]*	[10]*	[100]*	[0]*	[10]*	[100]*	[0]*	[10]*	[100]*
Vivos intactos (%)	55,9 ^a ± 8,8	69,3 ^b ± 5,6	67,7 ^b ± 7,5	55,8 ^a ± 8,6	69,8 ^b ± 6,6	68,5 ^b ± 6,7	54,7 ^a ± 8,2	66,9 ^b ± 8,4	64,6 ^b ± 8,5
Vivos danificados (%)	8,4 ^a ± 2,7	6,3 ^b ± 2,4	6,0 ^b ± 1,8	9,7 ^a ± 3,3	6,5 ^b ± 1,7	6,7 ^b ± 2,3	7,8 ^a ± 3,8	3,7 ^b ± 1,5	6,9 ^a ± 2,6
Mortos (%)	35,7 ^a ± 9,1	24,4 ^b ± 6,7	26,1 ^b ± 8,0	34,5 ^a ± 9,5	23,7 ^b ± 7,6	24,6 ^b ± 6,5	37,6 ^a ± 9,1	30,3 ^{ab} ± 11,1	38,5 ^b ± 9,4

Obs.: No interior de cada classe e para cada um dos diluentes as diferenças significativas em cada dia de conservação do sêmen, são expressas por letras diferentes ($p < 0,05$). [*] = ng/mL

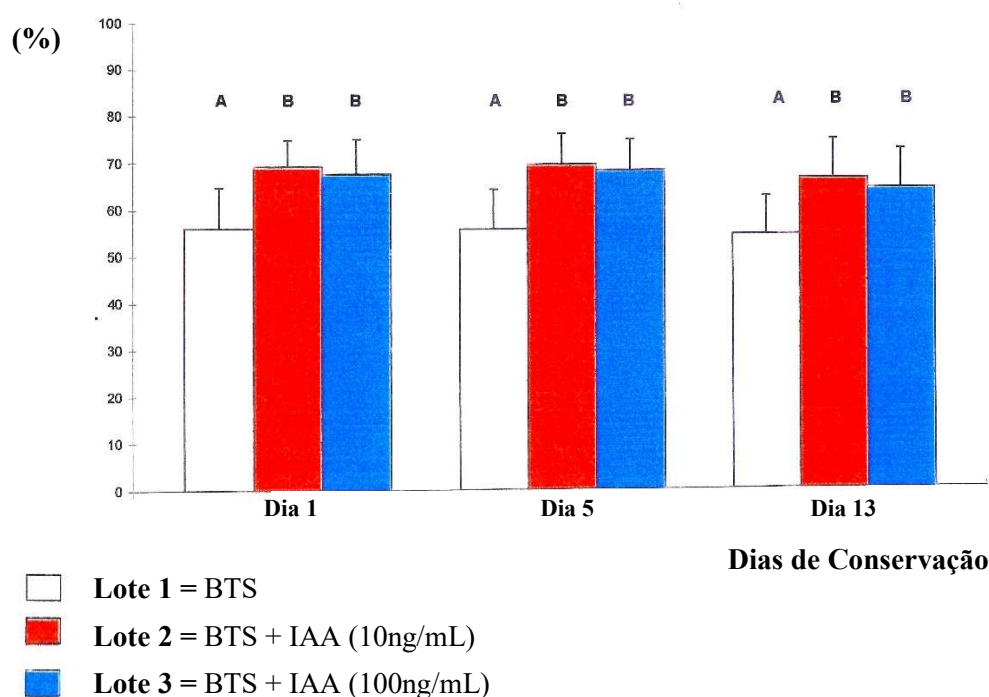
Na classe de espermatozoides vivos com acrossoma intacto e nos três diluentes, os valores em D13 foram ligeiramente inferiores aos obtidos em D1 e D5. Foi possível reparar que, dentro dessa classe, qual que fosse o diluente utilizado as diferenças entre os dias de conservação do sêmen não foram significativas ($p = 0,226$). Para os diferentes diluentes, o número de espermatozoides com acrossoma intacto foi sempre superior quando o IAA estava presente no meio de conservação. As diferenças foram então estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em qualquer um dos dias de conservação (D0, D5 e D13).

Dentro das classes de espermatozoides vivos com acrossoma danificado e mortos, os valores mais baixos foram sempre encontrados nos meios onde foi adicionado o IAA, com diferenças significativas em relação ao diluente controle ($p < 0,05$). Com relação as duas diferentes concentrações de IAA utilizadas, 10 e 100ng/mL, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nas três classes e nos três dias de análises.

2.2. Efeito do diluente sobre a morfologia dos espermatozoides

A adição do IAA no diluente BTS, em qualquer uma das concentrações utilizadas (10 ou 100ng/mL), melhorou sensivelmente a porcentagem dos espermatozoides que apresentavam melhores características morfológicas, durante todo período de conservação do sêmen, quando comparado aos resultados obtidos com o diluente BTS ($p=10^{-3}$). Esses resultados podem ser entendidos como um número de espermatozoides vivos com acrossoma intacto sempre superiores, em presença do IAA, em qualquer uma das duas concentrações utilizadas e em qualquer período de conservação considerado: 1, 5 ou 13 dias (Figura 10).

Figura 10: Influência do composto IAA no diluente BTS, sobre a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto, conservados a 15 °C, durante 13 dias.



Obs.: As diferenças entre os resultados médios são expressas por letras diferentes, dentro de cada dia de conservação.

III. 2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM O SÊMEN REFRIGERADO

01. Fertilidade e Prolificidade

Os resultados de fertilidade após as inseminações artificiais foram mensurados a partir do número de fêmeas que pariram em relação ao número total de porcas inseminadas. Os resultados de prolificidade foram avaliados pela média do total de leitões nascidos e os leitões nascidos vivos / fêmea (Tabela 13).

Os lotes de tratamento 1 e 2, não apresentaram diferenças significativas nos resultados de fertilidade e prolificidade. Nesses lotes, cada fêmea foi inseminada com duas doses de 3×10^9 sptz, sendo a primeira no dia da coleta do sêmen (D0) e a segunda no dia seguinte (D1). O IAA foi utilizado na concentração de 10ng/mL adicionado ao

diluyente do lote 2. De forma semelhante, os lotes 4 (BTS + IAA) e 5 (BTS), nos quais as fêmeas foram inseminadas com duas doses com 6×10^9 sptz cada uma, conservadas durante 5 (D5) e 6 (D6) dias. As diferenças encontradas nos resultados entre esses dois lotes não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabela 13: Fertilidade e prolificidade de fêmeas inseminadas com sêmen conservado no diluyente BTS adicionado ou não de IAA (10ng/mL).

Dia*	Condições			Resultados		
	Lotes (n)	BTS + IAA (ng/mL)	SPTZ ($\times 10^9$)	Fertilidade*** (% de partos)	Prolificidade**	
					Total	Vivos
D0/D1	1 (128)	0	2x3	80,5	11,3 $\pm$ 2,9	10,7 $\pm$ 2,9
	2 (128)	10	2x3	76,6	11,5 $\pm$ 3,6	11,1 $\pm$ 3,1
D5/D6	3 (140)	10	2x3	81,4	11,2 $\pm$ 3,5	10,6 $\pm$ 3,2
	4 (132)	10	2x6	80,3	11,4 $\pm$ 3,2	10,8 $\pm$ 2,9
	5 (106)	0	2x6	77,4	11,3 $\pm$ 3,1	10,7 $\pm$ 2,8

Um resultado inesperado e interessante foi observado no lote 5 (BTS). A fertilidade e a prolificidade, apesar de apresentarem resultados mais baixos do que os do lote 1 (77,4% e 10,7 $\pm$ 2,8 vs 80,5% e 10,7 $\pm$ 2,9), as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$). Isso aconteceu provavelmente devido ao fato de que o número de espermatozoides por inseminação no lote 5 foi o dobro do utilizado no lote 1. Quando as fêmeas foram inseminadas com 3×10^9 sptz (dose simples), após 5 a 6 dias de conservação do sêmen a 15 °C, na presença de 10ng/mL de IAA (lote 3), não foi visto decréscimo em relação ao lote 1, com relação aos resultados de fertilidade (81,4% vs 80,5% - $p > 0,05$) e de prolificidade (10,6 $\pm$ 3,2 vs 10,7 $\pm$ 2,9 - $p > 0,05$). Nesse lote 3, o número de espermatozoides utilizados nas inseminações no D5 foi o mesmo do lote 1 no D0 (duas vezes 3×10^9 sptz). Não foi incluído um lote controle BTS (duas vezes 3×10^9 sptz) em D5 e D6, devido ao fato de que fracos resultados de fertilidade eram esperados (PAQUIGNON, 1984).

Os resultados de fertilidade obtidos em D0 foram ligeiramente superiores, mas não significativos, com o uso do BTS em relação ao BTS + IAA (80,5% vs 76,6%). Após 5 dias de conservação, a utilização de dose dupla de espermatozoides (6×10^9 sptz) não apresentou resultados de partos significativamente diferentes para o lote utilizando BTS em relação ao que utilizou BTS + IAA (77,4% vs 80,3%).

O número total de embriões por leitegada foi idêntico em todos os lotes de tratamentos. Não houve também diferenças estatisticamente significativas entre o número de embriões vivos por barrigada. A presença do IAA adicionado ao BTS, não apresentou uma ação sobre essa característica reprodutiva suína, com o sêmen conservado no estado líquido. Entretanto, após 5 a 6 dias de conservação em presença do IAA no meio diluyente, uma dose simples de sêmen permitiu a obtenção de um número de embriões vivos (10,6 $\pm$ 3,2) equivalente aos obtidos em D0 e D1, com ou sem o IAA adicionado ao diluyente.

IV. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

IV. 1. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN REFRIGERADO: ESTUDO *IN VITRO*

01. Discussão

A pesquisa de melhores condições de conservação a fim de proteger a qualidade do sêmen do varrão, sem a perda do seu poder de fecundação, foi objeto de diversos trabalhos (BARITEAU et al., 1977; PAQUIGNON et al., 1987 e 1988; CHENG, 1988; GALLI e BOSISIO, 1988; SONE et al., 1992). Para todos os diluentes, dentre os quais o BTS é o mais difundido, o terceiro dia após a coleta aparece como o limite máximo de utilização do sêmen, com resultados compatíveis com níveis rentáveis de fertilidade e de prolificidade para os criadores (BARITEAU et al., 1977; STREZEZEK et al., 1979; PAQUIGNON et al., 1982 e 1987; GALLI e BOSISIO, 1988; REVELL e GLOSSOP, 1989; SONE et al., 1992).

No presente trabalho, as análises *in vitro* do sêmen do varrão, indicaram que não houve diferenças significativas dos parâmetros de motilidade na presença ou ausência do IAA no meio de diluição. Entretanto, durante o período de conservação do sêmen, e em particular após o terceiro dia de conservação, os lotes de sêmen nos quais se encontrava o IAA, apresentaram motilidades médias ligeiramente acima daquelas apresentadas no lote controle. Então, é possível se considerar que na utilização de um sêmen conservado mais de três dias após sua coleta, os resultados de fertilidade apresentação uma melhora devido à adição do IAA no meio diluente.

Com relação aos trabalhos de Kuciel e Szep (1994), os resultados desse trabalho são encorajantes, os níveis de mobilidade espermática ficaram estáveis até o quarto dia (96 horas) de conservação do sêmen a 15 °C no diluente BTS sozinho ou contendo o IAA (75 a 80% de espermatozoides móveis e 2,5 a 3,0 de vigor espermático). Esses autores obtiveram em seu trabalho apenas 35% de espermatozoides móveis, utilizando os diluentes SL97 e SL98, após 72 horas de conservação do sêmen.

Outros autores (VIJAYAKUMARAN e NEELAKANTA, 1980; CHENG, 1988), utilizaram diferentes diluentes (Kiew e IVT; Zorlesco e Zorpva, respectivamente) visando a conservação do ejaculado do varrão. Esses diluentes em suas fórmulas químicas, utilizam como fonte de energia a glicose e como antibióticos o sulfato de estreptomicina e a Benzilpenicilina sódica. Os resultados de mobilidade espermática obtidos por esses autores, a partir do segundo dia de conservação, foram mais fracos do que os encontrados em nosso trabalho.

A água de coco *in natura*, já demonstrou sua ação estimulante sobre os espermatozoides do carneiro (CHAIRUSSYUHUR et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1994), do cão (MONTEZUMA JÚNIOR et al., 1994) e do bode (TONIOLLI, 1989; SALLES e NUNES, 1994). Em relação ao IAA e sua ação *in vitro* sobre as características de mobilidade dos espermatozoides do varrão, outros compostos encontrados dentro da água de coco, são aparentemente necessários para que ela possa expressar plenamente seu efeito favorável sobre a mobilidade espermática.

As fortes concentrações de cálcio extracelular parecem apresentar um efeito inibidor sobre a mobilidade espermática. Na temperatura de 15 °C, com o cálcio em uma concentração superior a 0,5mM, pode provocar uma diminuição da motilidade do espermatozoide (NISHIMURA, 1993). Utilizamos concentrações de cálcio mais fortes do que aquelas utilizadas por esse autor, e não verificamos decréscimo da motilidade espermática. No entanto, foi observada uma queda importante da mobilidade espermática após três dias, utilizando-se uma forte concentração do cloreto de cálcio (41mM), corroborando com os resultados de White (1993), que mostraram no carneiro e no hamster, que uma forte concentração de cálcio no meio extracelular, tem um efeito negativo sobre a motilidade dos espermatozoides.

Parece provável que essa concentração, está em um nível superior aos de valores reais encontrados em tempo real. Com efeito, sabe-se que concentrações intracelulares do íon cálcio, são prioritariamente dependentes de sistemas específicos (canais de cálcio), do que uma de uma simples difusão ligada ao estado da membrana. Pode-se pensar que o cálcio restante contido no meio extracelular provoque um desequilíbrio nocivo à membrana dos espermatozoides.

Os resultados obtidos com a concentração de cálcio de 4,1mM, não estão de acordo com os de Lanzafame et al. (1994) que demonstraram que o cálcio não apresenta efeito significativo sobre a motilidade espermática no homem. Por outro lado, Prien (1992) obteve uma estimulação significativa da porcentagem de espermatozoides móveis no varrão. Esse autor utilizou o CaH_2PO_4 adicionado ao meio diluente e afirma que uma fonte extracelular de cálcio é necessária para a função normal do espermatozoide tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e que deve ser fornecido ao animal através da alimentação ou pela adição ao diluente de sêmen.

O cálcio iônico desempenha um papel regulador no controle da mobilidade espermática e do metabolismo energético da célula (NISHIMURA, 1993; WHITE, 1993). Ele é responsável por modificações bioquímicas importantes para as funções normais do espermatozoide. Entretanto, não conhecemos a origem do cálcio que chega no testículo para desempenhar suas funções (PRIEN, 1992). Após a ejaculação, os espermatozoides são submetidos a um processo de capacitação e a reação acrossômica é acompanhada por um aumento da concentração intracelular do cálcio. Essa reação não pode ser produzida em um meio desprovido de cálcio. No cavalo (MAGISTRINI e CROZET, 1990) e no varrão (ZHOU et al., 1990), as modificações da permeabilidade de membrana aos íons, e em particular ao cálcio durante a capacitação, são responsáveis pela modificação da mobilidade espermática. Ashworth et al. (1994), obtiveram, no sêmen do carneiro, um aumento do número de espermatozoides móveis após a adição de 2mM de cálcio no meio diluente.

Considera-se que o plasma seminal desempenha um papel importante sobre os espermatozoides em diversos níveis do sistema reprodutivo do varrão, mas igualmente no trato genital feminino: capacitação e regulação do transporte espermático (BRUTGANS, 1982; RATH et al., 1989; WEITZE, 1990 e WEITZE et al., 1992; WARBESKI et al., 1995), estimulação da fecundação e do número de espermatozoides acessórios na zona pelúcida (WEITZE et al., 1988b e 1990b; WILLMEN, 1989;

WABERSKI et al., 1995) e estimulação da contração uterina (CLAUS et al., 1985 WEITZE et al., 1990a).

No presente trabalho, o plasma seminal, adicionado em diferentes concentrações no meio diluente (BTS) do sêmen, mostrou sua importância na melhoria da mobilidade espermática. Essa ação favorável havia sido anteriormente demonstrada no hamster e no porquinho da Índia por Bavister et al. (1978) e no varrão por Brutgans (1982). Esse último autor, denominou a substância ativa presente no plasma seminal, por fator espermática da motilidade (FEM). No hamster, foi demonstrado que esse fator é essencial para assegurar a mobilidade do espermatozoide, permitir a reação acrossômica e induzir a fecundação *in vitro*.

Entretanto, no presente estudo, foram constatados resultados mais fracos quando o sêmen foi conservado puro (*in natura*). A queda acentuada da mobilidade espermática foi provavelmente devido à ausência de antibióticos adicionados normalmente ao diluente. De fato, foi notada uma proliferação bacteriana importante no meio diluente. Nossos resultados, corroboram com os de du Mesnil du Buisson (1957), que apresentaram uma queda bastante importante dos valores da mobilidade espermática após o segundo dia de conservação do sêmen puro entre 17 e 20 °C. Esse autor reparou que a adição de sulfamidas permitiu uma nítida melhoria da mobilidade após conservação do sêmen (notadamente ao terceiro dia).

O efeito benéfico do plasma seminal sobre os espermatozoides demonstrado nos resultados desse trabalho utilizando sêmen refrigerado, está de acordo com os resultados de vários outros autores, no sêmen do varrão (WEITZE et al., 1988b, 1990b, 1990c e 1990d; RATH et al., 1989; WABERSKI et al., 1995), no hamster (BAVISTER et al., 1978), no touro (AL-SOMAI et al., 1994) e no carneiro (ASHWORTH et al., 1994). No carneiro e no touro, o efeito protetor do plasma seminal é devido a uma fração proteica denominada 5 a 10 Kda. No varrão, é necessário se determinar se uma apenas ou várias substâncias estão implicadas nessa ação.

As frações separadas pela filtração em gel (I, III, IV e VI), que foram escolhidas para serem testadas separadamente, não apresentaram efeito estimulante sobre a mobilidade espermática. Segundo Iwamoto et al. (1992), vários componentes do plasma seminal, originários da próstata, exercem uma atividade positiva sobre a motilidade dos espermatozoides. Al-Somai et al. (1994), demonstraram que o plasma seminal bovino, contém substâncias, de peso molecular entre 5.000 e 12.000, que possuem efeito deletério sobre os espermatozoides. A interação do plasma seminal com a sobrevivência dos espermatozoides no cavalo, foi demonstrado por Palmer (1985) e por Seguin et al. (1995). Como nos bovinos (AL-SOMAI et al., 1994), seu efeito deletério depende da concentração do plasma seminal no meio diluente. Em diluições mais altas, a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* pode ser prolongada. Aparentemente, devido ao fato da separação desses componentes, os resultados com as frações individuais foram inferiores. Um estudo mais aprofundado, com a combinação de várias dessas frações entre elas, poderá talvez minimizar o efeito do plasma inteiro.

Os resultados obtidos no presente trabalho, sugerem igualmente que um ou vários componentes do plasma seminal possuem uma ação positiva específica sobre os espermatozoides. Com efeito, quando é feita a substituição do plasma seminal por certas

proteínas (BSA, leite desnatado e transferrina ovina) em concentrações semelhantes, os resultados da mobilidade espermática são inferiores, mesmo após 3 horas de incubação do sêmen.

Os trabalhos de Kuo e Chiang (1991) demonstraram que a adição do BSA em concentrações entre 1 e 3% adicionado no sêmen do varrão, antes da congelação, não estimulou a mobilidade espermática após a descongelação. A ação da BSA sobre a célula espermática é um assunto ainda contraditório, uma vez que Waberski (1988) afirma que a adição da BSA no meio após a descongelação do sêmen, melhora a mobilidade espermática. Nesse trabalho, a adição da BSA no diluente, não evidenciou nenhuma ação sobre a mobilidade espermática em relação ao tratamento controle (plasma seminal). Esses resultados estão de acordo com os de Ashworth et al. (1994), que, adicionando ao meio diluente do sêmen do carneiro, 4mg de BSA mL⁻¹, não obtiveram um efeito estimulante sobre a porcentagem de espermatozoides móveis.

O leite desnatado é utilizado como um diluente do sêmen de diversas espécies: o touro (PHILLIPS e LARDY, 1940; MICHAJLOV, 1950; JACQUET e CASSOU, 1952), o cavalo (PALMER, 1985), o carneiro (COLAS et al., 1968; MAXWELL e SALAMON, 1993) e o homem (SCOBAY et al., 1995). Um efeito estimulante foi observado nos resultados de fertilidade. Segundo nossos resultados, essa ação estimulante do leite, não pode ser demonstrada *in vitro*, em ausência do plasma seminal no meio de diluição do sêmen. Einarsson et al. (1972) utilizando o plasma seminal no lugar do leite desnatado, para a descongelação do sêmen do varrão, obtiveram uma melhor taxa de fertilidade das porcas inseminadas. No carneiro, quando o sêmen é conservado a 4 °C (COLAS et al., 1968) e no homem, quando a gema de ovo é adicionada ao meio de conservação (SCOBAY et al., 1995), o efeito estimulante do leite desnatado não aparece mais nos resultados. Pensamos que o leite desnatado poderá eventualmente, ser utilizado como diluente do sêmen do varrão, mas à condição que o plasma seminal esteja presente no meio de diluição.

A observação apenas da motilidade, não é suficiente para se determinar a qualidade potencial do sêmen (EINARSSON e VIRING, 1973). A morfologia espermática é igualmente um indicador importante dessa qualidade porque, dentro de uma certa medida, ela tem uma influência sobre a taxa de parto e a prolificidade (WABERSKI et al., 1990), mesmo que as correlações entre mobilidade espermática, morfologia e fertilidade sejam fracas (GALLI e BOSISIO, 1988).

Os resultados do presente estudo, apresentaram uma melhoria significativa do número de espermatozoides com acrossoma íntegro, quando da adição do IAA no diluente BTS. Essa melhoria, associada a uma boa motilidade do sêmen, permite uma previsão de bons resultados de fertilidade. Esse raciocínio vai de encontro aos trabalhos de Vásquez (1980) e de Wekerle (1982), com o varrão e de Parinaud et al. (1995) no homem. Nesses trabalhos os autores mostraram que a integridade da membrana plasmática e a do acrossoma dos espermatozoides classificados como “vivos normais”, são parâmetros essenciais para que a fecundação possa acontecer. Entretanto, Parinaud et al. (1995) demonstraram que prever *in vitro* a capacidade de fecundação de um sêmen, depende de uma análise do conjunto da motilidade, da morfologia e da reação acrossômica.

Levando-se em consideração o bom estado morfológico da célula espermática, conforme definido acima, é também importante os parâmetros como a concentração e o vigor espermático, para estabelecimento de programas de inseminação artificial (ZEUNER, 1992; BONET et al., 1993). Apesar da fraca correlação entre a morfologia e a taxa de partos (GALLI e BOSISIO, 1988), uma membrana celular intacta é essencial para a reação do espermatozoide com a zona pelúcida do ovócito com acrossoma bem formado a fim de que o processo de fecundação possa acontecer normalmente em toda sua plenitude.

Durante a conservação do sêmen, o número de espermatozoides com o acrossoma intacto ficou estável entre D1 e D13. Mesmo após esse longo período, a porcentagem ficou sempre acima dos 50% e sempre mais elevada na ausência ou presença do IAA no meio diluente. Ela foi também igualmente superior aos resultados obtidos por outros autores como Slaweta et al. (1981), Wekerle (1982), Castillo et al. (1988) e Peres Marcos et al. (1991). Entretanto, apesar dos resultados elevados que obtivemos em D5 e D13 (69,8 e 66,9%, respectivamente) não foi possível chegar aos níveis (75%) que Revelle e Glossop (1989) obtiveram em D17 utilizando o diluente Reading. Com a utilização do diluente Zorpva, esses autores obtiveram resultados semelhantes aos desse nosso trabalho (65%). Essa vantagem a favor do diluente Reading, pode ser devido ao fato de que os antibióticos lincomicina e espectinomicina, foram utilizados no lugar da penicilina.

Numerosos fatores precisam ser considerados dentro da análise de um ejaculado e suas possibilidade de fecundar: no macho, a qualidade da membrana celular do espermatozoide (ZAGORSKI et al., 1992), a presença da gota citoplasmática (ZEUNER, 1992), o choque térmico (PURSEL et al., 1973) e a qualidade do DNA; na fêmea, a idade, o estado de saúde e o momento da ovulação em relação ao momento da inseminação. Não pode ser esquecida a influência de estressantes do meio ambiente (barulhos, calor, etc) sobre o comportamento dos animais, em particular o varrão, que aumenta sensivelmente o número de espermatozoides anormais no ejaculado (BONET et al., 1993).

Os resultados do presente trabalho, sugerem uma ação protetora do IAA favorecendo a sobrevivência de um maior número de espermatozoides normais. A literatura apresenta resultados positivos no tocante as características morfológicas, com utilização do BTS em relação do diluentes Kiev e Zorlesco (SLAWETA et al., 1981; CASTILLO et al., 1988; CHENG, 1988; PEREZ MARCOS et al., 1991). Um estudo mais importante, em um total de 1700 porcas, confirmou que a adição do IAA ao diluente BTS, permitiu uma melhor preservação da integridade acrossomal após 4 dias de conservação do sêmen. No nosso trabalho, resultados melhores foram obtidos com a adição do IAA ao diluente BTS. A melhoria da condição morfológica da célula espermática em presença do IAA, em particular a integridade do seu acrossoma, pode favorecer seu deslocamento e a penetração na zona pelúcida do ovócito. É possível dessa forma que seja visualizada uma melhoria nos resultados de fertilidade com a utilização de um sêmen assim conservado.

02. Conclusões

- ★ A adição do IAA aumentou a porcentagem de espermatozoides vivos normais. Apesar da ausência de uma ação significativamente estimulante sobre a mobilidade espermática, esse composto assegura uma melhor condição de conservação das características morfológicas do espermatozoide do varrão;
- ★ Os resultados desse trabalho permitiram visualizar melhores condições para programas de inseminação artificial utilizando o sêmen refrigerado e a obtenção de níveis de fertilidade superiores aos observados habitualmente;
- ★ As doses mais fracas de cálcio, apresentaram uma ação positiva sobre a mobilidade espermática. As respostas não foram homogêneas e a melhor concentração com efeito significativo deve ainda ser bem estabelecida. Estudos complementares são necessários para a compreensão do mecanismo de ação do cálcio sobre a célula espermática suína. Esses estudos permitirão um aprofundamento e a determinação de forma mais detalhada, da concentração ótima de cálcio a ser adicionado ao diluente de sêmen;
- ★ Aparentemente, não houve efeito adicional entre o cálcio e o IAA;
- ★ O efeito estimulante do plasma seminal sobre a mobilidade espermática, foi confirmado e sendo específico. Ele deve estar associado a um diluente para poder otimizar seu efeito.

IV. 2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM O SÊMEN REFRIGERADO

01. Discussão

A pesquisa das condições de estocagem prolongada para o sêmen do varrão sem a perda do seu poder fecundante, foi objeto de vários trabalhos (BARITEAU et al., 1977; SLAWETA et al., 1981; PAQUIGNON et al., 1987 e 1988; CHENG, 1988; GALLI e BOSISIO, 1988; SONE et al., 1992). Na espécie suína, o terceiro dia após a coleta representa um limite prático da utilização do sêmen, após a qual é observado uma baixa dos níveis de fertilidade e de prolificidade que se apresentam com resultados muito baixos para a prática da criação de suínos (BARITEAU et al., 1977; STRZEZEK et al., 1979; PAQUIGNON et al., 1982 e 1987; GALLI e BOSISIO, 1988; JOHNSON et al., 1988; REVELL e GLOSSOP, 1989; SONE et al., 1992). Waberski et al. (1992) consideram que em condições normais de utilização, uma queda do poder fecundante do sêmen suíno refrigerado não pode ser evitada.

Os resultados do presente trabalho sugerem que poderá ser possível utilizar o sêmen suíno após o terceiro dia de conservação, mantendo-se a qualidade dos resultados de fertilidade e prolificidade. No ano de 1991 foi demonstrado o efeito benéfico da água de coco para a diluição do ejaculado do varrão (TONIOLLI, 1991). A partir desses

resultados, pesquisamos se o produto ativo (IAA) que ela contém seria igualmente eficaz sobre o poder fecundante dos espermatozoides do varrão. Em nossa experimentação *in vivo*, a adição do IAA ao diluente BTS permitiu de manter um nível de fertilidade (81,4%) e de prolificidade (10,6 leitões vivos/barrigada), tão bom quando o obtido em D0 com o tratamento controle. Esses resultados foram obtidos com doses simples de sêmen (3×10^9 sptz) conservadas durante 5 dias a 15 °C.

Esses resultados foram superiores aos obtidos por diversos autores em diferentes trabalhos (JOHNSON et al., 1982 e 1988; WEITZE, 1990; MACHATY et al., 1992; WABERSKI et al., 1992), que utilizaram o sêmen suíno estocado entre três e cinco dias e diluídos em diferentes diluentes (BTS, Modena, Kiev, BL-1, Androhep e Zorlesco). Os resultados de fertilidade e de prolificidade desses autores, não ultrapassaram os valores médios de 69,2% e 9,3 leitões/barrigada. Os diluentes BL-1 (PURSEL et al., 1973) e Guelph (PAQUIGNON et al., 1979) permitiram a conservação do sêmen suíno sem baixa do poder fecundante do espermatozoide até o terceiro dia de conservação após a coleta (BARITEAU et al., 1977; PAQUIGNON et al., 1980). Após esse período, a eficácia desses diluentes pode ser prolongada de um dia, à condição de se utilizar uma dose dupla de sêmen por fêmea inseminada. Machaty et al. (1992) utilizando o diluente BTS com doses de 5×10^9 sptz, conservados por quatro dias, obtiveram uma taxa de parto de 74,5% e uma prolificidade de 9,5 leitões/barrigada.

Johnson et al. (1988) mostraram que a utilização do sêmen suíno dependa da possibilidade do diluente induzir um metabolismo ótimo nos espermatozoides, facilitando assim a sua estocagem. Aparentemente o diluente utilizado nesse trabalho, apresenta essa propriedade: o resultado prático mais interessante trazido por nossas experimentações foi a possibilidade de conservação do sêmen do varrão durante 5 dias a 15 °C no diluente BTS, adicionado 10ng de IAA/mL. Dessa forma, a presença do IAA, utilizando-se doses simples de sêmen (3×10^9 sptz) ou duplas (6×10^9 sptz), os resultados de fertilidade e de prolificidade observados em D5/D6 foram idênticos aos observados em D0/D1, com o uso da dose simples. Esses resultados permitem visualizarmos uma mais larga utilização do sêmen de reprodutores selecionados, uma vez que não haverá mais a necessidade/obrigatoriedade de se dobrar a quantidade de espermatozoides, visando a utilização com o sêmen conservado até cinco ou seis dias.

Esse foi um resultado de certa forma inesperado e como o número de animais disponíveis para as experimentações era limitado, não foi previsto um lote controle para os dias D5 e D6 utilizando o BTS com uma dose simples, tendo sido apenas utilizado um lote com dose dupla de espermatozoides. De fato, os resultados encontrados na literatura (BARITEAU et al., 1977; STRZEZEK et al., 1979; PAQUIGNON et al., 1982 e 1987; PAQUIGNON, 1984; GALLI e BOSISIO, 1988; REVELL E GLOSSOP, 1989; BHUYAN et al., 1992; SONE et al., 1992), bem como a opinião geral dos pesquisadores e técnicos trabalhadores nesse meio, nos levaram a pensar que os resultados, nessas condições, seriam ruins.

Todos os resultados sugerem fortemente um favorável do IAAS, mas não o demonstraram formalmente. Entretanto, a comparação dos resultados presentes com os da literatura, foram fortemente a favor de um efeito positivo do IAA sobre a conservação do espermatozoide do varrão a 15 °C. Um estudo mais importante (total de 1700 porcas)

não pode colocar em evidência um efeito favorável da adição do IAA ao diluente BTS, sobre a fertilidade de porcas inseminadas. De fato, o efeito do IAA parece acima de tudo, diferente dependendo das amostras de dados consideradas, seja entre varrões, entre ejaculados ou entre criações.

O ácido 3-indol acético (IAA) é conhecido já há muito tempo como o principal hormônio vegetal denominado auxina, entretanto, seu mecanismo molecular foi descoberto apenas em 1995 (BARBIER-BRYGOO, 1995). A auxina fica ligada a uma proteína de ligação (ZmER-abp 1) para formar um complexo associado ao receptor transmembranário que desencadeia várias respostas das células vegetais.

A interação entre o fator de crescimento dérmico animal (EGF) e o IAA foi demonstrado. A ação do complexo EGF-IAA é muito mais forte do que a do IAA sozinho, sobre o crescimento de coleópteros nos vegetais (MOON et al., 1994). É possível que o IAA ligado ao EGF ou a uma outra molécula, possa potencializar essa ação nos mamíferos.

É conhecido que o IAA pode acelerar a peroxidação lipídica em presença de peroxidase e de peróxido de hidrogênio (CANDEIAS et al., 1995). No carneiro, é conhecido que a alteração dos lipídios da membrana do espermatozoide pode ter um efeito nefasto sobre a capacidade fecundante do gameta (WINDSOR et al., 1993). Nas nossas condições de experimentação (ausência de peroxidase e de H_2O_2) é pouco provável que o IAA pudesse estimular a peroxidação lipídica à nível dos espermatozoides.

O IAA pode também formar um complexo com a glutathione-S-Transferase (GST) e reduz sua ação sobre os substratos de origem vegetal de uma forma não competitiva (BILANG e STURN, 1995). No rato, a atividade GST foi demonstrada à vários níveis no trato genital: células epididimárias (ROBAIRE e VIGER, 1995), espermátócito no estágio de paquíteno, espermátide e gotas citoplasmáticas (YOGANATHAN et al., 1989; PAPP et al., 1994; VERI et al., 1994) e a GST de classe μ , foi detectada nos espermatozoides do rato e do camundongo (ARAVINDA et al., 1995; FULCHER et al., 1995). A GST foi observada também sobre o acrossoma por imunocitoquímica (ARAVINDA et al., 1995). Dessa forma, não é excluído que o IAA possa ter um efeito favorável sobre a proteção do acrossoma, com a interação com a GST.

Morre et al. (1995) demonstraram que o IAA acelera a atividade da proteína disulfídio-isomerase (PDI) presente na membrana plasmática da soja. A atividade do PDI foi igualmente encontrada sobre a membrana plasmática de plaquetas sanguíneas (ESSEX et al., 1995) e de hepatócitos (TERADA et al., 1995) de mamíferos. É conhecido que o PDI permite uma renaturação correta de proteínas através da atividade *chaperon-like* (SONG e WANG, 1995). Presente igualmente no acrossoma (OHYTANI et al., 1993), o PDI participa das modificações de proteínas acrossomais durante o processo de capacitação espermática. Uma vez que o principal efeito observado do IAA sobre os espermatozoides do varrão foi a manutenção da integridade do acrossoma, podemos construir a hipótese de que esse efeito seria principalmente devido à estimulação do PDI acrossomal.

Não se sabe se o IAA é a única molécula responsável do efeito protetor da água de coco sobre a conservação do sêmen do varrão. A composição do líquido endospermico desse fruto é muito complexa e apresenta numerosos elementos: minerais, açúcares,

proteínas, hormônios, etc. As concentrações de IAA utilizadas nesse trabalho (10 e 100ng/mL), estão próximas da concentração da auxina ativa (40ng/mL) encontrada no líquido endospermico do coco à idade de nove meses, do seu desenvolvimento (DUA e CHANDRA, 1993). Entretanto, não se pode excluir que outras moléculas presentes na água de coco, possam agir sobre a viabilidade espermática no varrão. O IAA parece ser responsável por uma parte dessa ação estimulante.

02. Conclusões

- ★ Os resultados desse trabalho, permitiram visualizar a inseminação artificial suína com o sêmen conservado até 6 dias após sua coleta, utilizando o IAA na concentração de 10ng/mL, sem que seja necessário se dobrar a concentração espermática da dose inseminante. Essa possibilidade permite de inseminar com um mesmo ejaculado, uma quantidade mais importante de fêmeas;
- ★ Um melhor domínio da utilização do sêmen durante 6 dias sem a perda do seu poder fecundante, permitirá um melhor gerenciamento das criações no manejo de criação de fêmeas em bandas após o desmame;
- ★ O efeito do diluente não foi o mesmo de acordo com a qualidade espermática.

REFERÊNCIAS

- AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAN, P.C. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Reproduction, Fertility and Development**, v.6, p.165-171, 1994.
- ARAVINDA, S.; GOPALAKRISHNAN, B.; DEY, C.S.; TOTTEY, S.M.; PAWSHE, C.H.; SALUNKE, D.; DAUR, K.; SHAHA, C. A testicular protein importante for fertility has glutathione-S-transferase activity and is localized extracellularly in the seminiferous tubules. **Journal of Biology and Chemistry**, v.270, p.15675-15685, 1995.
- ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.A.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. Survival ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.6, p.173-180, 1994.
- BARBIER-BRYGOO, H. Tracking auxin receptors using functional approaches. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p.1-25, 1995.
- BARITEAU, F.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M. Insémination artificielle porcine. Amélioration techniques, résultats récentes. **Journées de Recherche Porcine em France**, v.9, p.11-14, 1977.
- BARITEAU, F.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; PAQUIGNON, M. Insémination artificielle porcine. Mise en place par l'éleveur ou par l'inséminateur. Bilan technique et

résultats pratique: intérêt de la méthode. **Journées de Recherche Porcine em France**, v.16, p.173-180, 1984.

BAVISTER, B.D.; ROGERS, B.J.; YANAGIMACHI, R. The effects of cauda epididymal plasma on the motility and acrosome reaction of hamster and guinea pig spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.19, p.358-363, 1978.

BHUYAN, G.; BORGOHAIN, B.N.; AHAMED, K.; DECKA, B.C. Effect of Kive, GPSE-1 and BL-1 extenders on the semen quality of crossbred boar. **Indian Journal of Reproduction**, v.13, p.41-43, 1992.

BILANG, J.; STURM, A. Cloning and characterization of a glutathione-S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. **Plant Physiology**, v.109, p.253-260, 1995.

BLICHEFELDT, T.; ALMLID, T.; STAVNE, S.E. **Liquid preservation of boar semen in Kiev or BTS. A field comparison**. In: XI International Congress of Animal Reproduction and Artificial Inseminations, Dublin, p.229-231, 1988.

BONET, S.; BRIZ, M.; FRADERA, A. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.40, p.383-396, 1993.

BRUTGANS, Y.P. The role of boar semen plasma in fertilisation. **Referativny Zhurnal**, p.83-88, 1982.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives: substituent effects. **Free Radical Research**, v.23, p.403-418, 1995.

CASTILLO, A.G.; ANGELES, J.B.; FLORES, M.A.S.; FIERRO, R.N. Evaluación del dano acrosomal em espermatozoides de semen de cerdo almacenado em BTS. **Veterinary**, v.19, p.65, 1988. (abstract)

CHAIRUSSYUHUR, A.; SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; MADDOCKS, S.; SETCHELL, B.P. Quail yolk and coconut extract in diluents for storage of ram semen at 30 and 5 °C. In: XXV **Animal Conference**, p.72, 1993. (abstract)

CHENG, W.T.K. Preservation of boar semen at 15 oC. **Journal of Chinese Society and Veterinary Science**, v.14, p.339-350, 1988.

COLAS, G.; DAUZIER, J.; COUROT, M.; ORTAVANT, R.; SIGNORET, J.P. Résultats obtenus au cours de l'étude de Quelques facteurs importants de l'insémination artificielle ovine. **Annales de Zootechnie**, v.16, p.45-57, 1968.

CLAUS, R.; SCHOPPER, D.; HUANG VU, C. Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. **Acta Endocrinológica**, v.109, p.281-288, 1985.

Du MESNIL du BUISSON, R. Conservation du sperme de verrat sans dilution: conditions d'examen. **Annales de Zootechnie**, v.4, p.391-399, 1957.

DUA, L.S.; CHANDRA, M. **The identification and isolation of plant growth redulation substances from the liquid endospermo *Cocos nucifera***. In: Advances in coconut Research and Development, New Delhi (Índia), p.219-227, 1993.

EINARSSON, S.; VIRING, L. Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different intervals after insemination, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.32, p.117-120, 1973.

EINARSSON, S.; SOOSALU, O.; SWENSSON, S. On the fertility and survival of deep frozen boar spermatozoa thawed in skim milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.13, p.446-458, 1972.

ESSEX, D.W.; CHEN, K.; SWIATKOWSKA, M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. **Blood**, v.86, p.2168-2173, 1995.

FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. **Parâmetros andrológicos y evolución in vitro del semen de ovinos deslanados em la region litoral del nordeste brasileo durante la estacion seca y lluviosa**. In: VII International Congress of Reproduction Animal, Murcia, p.115, 1994. (abstract)

FULCHER, K.D.; WELCH, J.E.; KLAPPER, D.G.; O'BRIEN, D.A.; EDDY, E.M. Identification of a unique μ -class glutathione-S-transferase in mouse spermatogenic cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.415-424, 1995.

GALLI, A.; BOSISIO, M. Quality of semen stored at +15/16 °C as related to fertility of artificially inseminated swine. **Theriogenology**, v.30, p.1185-1189, 1988.

IWAMOTO, T.; TSANG, A.; LUTERMAN, M.; DICKSON, J.; LAMIRANDE, E.; OKUNO, M.; MOHRI, H.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.55-62, 1992.

JACQUET, J.; CASSOU, R. New work with skim milk as a basis for the dilution and preservation of bull semen. (Trans. Title). **Bulletin of French Veterinary Academy**, v.25, p.149-155, 1952.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; WILLEMS, C.M.T.; SYBERMA, W. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertility capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. **Journal of Animal Science**, v.52, p.1130-1136, 1981.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; ARTS, J.A.M. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. II. Fertility capacity of fresh and frozen spermatozoa in gilts at a fixed time or according to walsmete readings. **Journal of Animal Science**, v.54, p.126-131, 1982.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; GROOTEN, J.J.G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified Modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. **Zuchthygiene**, v.23, p.49-55, 1988.

KOVACS, A.; FOOTE, R.H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic & Histochemistry**, v.67, p.119-124, 1992.

KUCIEL, J.; SZEP, M. Individual differences in spermatozoa survival in boars. **Zivocisna Vyroba**, v.39, 795-800, 1994.

KUO, Y.H.; CHIANG, J.C. The fertility of frozen boar semen prepared in macrotubes. **Reproduction in Domestic Animals**, suppl. 1, p.353-357, 1991.

LANZAFAME, F.; CHAPMAN, M.G.; GUGLIELMINO, A.; GEARON, C.M.; FORMAN, R.G. Pharmacological stimulation of sperm motility. **Human Reproduction**, v.9, p.192-199, 1994.

MACHATY, Z.; TAKACS, T.; GATHY, I. Fertilizing capacity of boar semen diluted with Belstville (BTS) and modified Kiev (MK) extenders in relation to storage time and number of spermatozoa per insemination dose. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.289-295, 1992.

MAGISTRINI, M.; CROZET, N. Capacitation et réaction acrosomique chez les animaux domestiques. **Contraception and Fertility Sexuality** v.18, p.785-789, 1990.

MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen:a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.613-638, 1993.

MICHAJILOV, N.N. Sperm dilution in the milk. Czechoslovak Vet Mag Jan, v.10, (abstract), **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p.117-337, 1950.

MONTEZUMA JÚNIOR, P.A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J.F. **Utilização da água de coco in natura com adição de gema de ovo como diluente de congelação do sêmen canino, em paillets de 0,5mL**. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, p.535, 1994. (resumo)

MOON, A.M.; DYER, M.I.; BROWN, M.R.; CROSSLEY JÚNIOR, D.A. Epidermal growth fator interacts with índole-3-acetic acid and promotes coleoptile growth. **Plant Cells Physiology**, v.35, p.1173-1177, 1994.

MORRE, D.J.; DECABO, R.; JACOBS, E.; MORRE, D.M. Auxin-modulated protein disulfide-thio-interchange activity from soybean plasma membranes. **Plant Cells Physiology**, v.109, p.573-578, 1995.

NISHIMURA, K. Effects of calcium ions on the malate-aspartate Shuttle in slow-cooled boar spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.49, p.537-543, 1993.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. **Dilueur de sperm comprenant um dérivé d'Indolle**. Brevet n° 94. Publication avril, 1994.

OHYTANI, H.; WAKUI, H.; ISHINO, T.; KOMATSUDA, A.; MIURA, A.B. An isoform of protein disulfide isomerase is expressed in the developing acrosome of spermatids during rat spermiogenesis and transported into the nucleus of mature spermatids and epididymal spermatozoa. **Histochemistry**, v.100, p.423-429, 1993.

OLIVEIRA, L.F.; EVANGELISTA, J.J.F.; BEZERRA, M.B.; NUNES, J.F. **Água de côco *in natura* adicionada ou não de gema de ovo sob a forma estabilizada de gel como diluidor do sêmen ovino**. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, p.561, 1994. (resumo)

PALMER, W. Insémination artificielle de la jument. Bilan de 5 années de recherche et d'utilisation pratique. **Bulletin Groupe des Techniciens Vétérinaire**, v.1, p.67-78, 1985.

PAPP, S.; ROBAIRE, B.; HERMO, L. Developmental expression. Of the glutathione-S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis using light microscope immunocytochemistry. **Ants Records**, v.240, p.345-357, 1994.

PAQUIGNON, M. Semen technology in the pig. **Current Tropical Veterinary Medicine and Animal Science**, v.30, p.202-218, 1984.

PAQUIGNON, M.; BARITEAU, F.; BUSSIÈRER, F.; COUROT, M. Conservation prologée du sperme frais de verrat. **Journées de Recherche Porcine em France**, v.11, p.323-328, 1979.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRER, F.; BARITEAU, F.; COUROT, M. Effectiveness of frozen boar semen under practical conditions of artificial insemination. **Theriogenology**, v.14, p.217-226, 1980.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRER, F.; DACHEUX, J.L.; COUROT, M. Effet du dilueur, du taux de dilution et du plasma seminal sur la fertilité des truies après une longue conservation de la semence. **Journées de Recherche Porcine em France**, v.14, p.85-90, 1982.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRER, F.; BARITEAU, F. Résultats recentes em matière de technologie de la conservation de la semence de verrat. **Journées de Recherche Porcine em France**, v.19, p.63-78, 1987.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRER, F.; BARITEAU, F. Efficacité des techniques de conservation de la semence de verrat. **INRA Production Animale**, v.1, p.271-280, 1988.

PARINAUD, J.; VIEITEZ, G.; MOUTAFFIAN, H.; RICHAILLEY, G.; LABAL, B. Relevance of acrosome function in the evaluation of semen *in vitro* fertilizing ability. **Fertility and Sterility**, v.63, p.598-603, 1995.

PEREZ MARCOS, C.; SANCHEZ, R.; PALACIO, M.; PURSEL, V.G.; PEREZ GARCIA, T.; MARTIN RILLO, S. Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stores at 15 °C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.26, p.112-116, 1991.

- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v.23, p.399-404, 1940.
- PRIEN, S.D. **A comparative study of calcium utilization in human and porcine spermatozoa**. Thesis of Doctorat, Michigan, 157p., 1992.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.37, p.528-531, 1973.
- RATH, D.; WEITZE, K.F.; PENA ALFARO, C.E.; ANDRADE MOURA, J.C. Effects of seminal plasma on the number of accessory sperm cells and fertilization in gilts. **Zuchthygiene**, v.24, p.123-127, 1989.
- REED, H.C.B.; CURNOCK, R.M. **Comparison of three liquid semen diluents in a national semen delivery servisse in Great Britain**. In: II International Congress on Boar Semen Preservation, Paul Parey Publisher, Berlin, p.369-373, 1991.
- REVELL, S.G.; GLOSSOP, C.E. A long-time ambient temperature diluente for boar semen. **Animal Production**, v.48, p.579-584, 1991.
- ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epitelial cell functions. **Biology of Reproduction**, v.52, p.226-236, 1995.
- SALLES, M.G.F.; NUNES, J.F. **Avaliação *in vitro* do sêmen caprino diluído em água de côco *in natura* e fração B**. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, p.533, 1994. (resumo)
- SCOBAY, M.J.; BIELFELD, J.S.; KRÜSSEL, J.S.; JEYENDRAN, R.S. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. **Andrologia**, v.57, p.229-231, 1955.
- SEGUIN, F.; MAGISTRINI, M.; BEAU, P.; AKOKA, S.; PALMER, E.; LE PAPI, A. Preliminary analysis of equine seminal plasma bay 1H NMR. **Journal of Magnetic Resonance Analyses**, p.53-57, 1995.
- SLAWETA, R.; SIKORSKAL, J.; STRZEZEK, J. The effect of storing boar semen at 15-18 °C for varying length of time on the morphology and biological value of spermatozoa. **Medycyna Weterynaryjna**, v.37, p.687-690, 1981.
- SONE, M.; CHIKYU, M.; YOSHIDA, M.; BAMBA, K.; OGASA, A. Storage of boar semen in liquid form. **Japanese Journal of Swine Science**, v.29, p.41-50, 1992.
- SONG, J.L.; WANG, C.C. Chaperon-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. **European Journal of Biochemistry**, v.231, p.312-316, 1995.
- STRZEZEK, J.; SMIGIELSKA, J.; LIMINOXICZ, J.; CZECZOT, H.; GLOGOWSKI, J. Metabolismo f boar semen diluted in diferente diluentes and stored at 18-20 °C. **Wojewódzki Zakład Weterynarii**, p.153-162, 1979.

TERADA, K.; MANCHIKALAPUDI, P.; NOIVA, R.; STOCKERT, R.J.; SCHILSKY, M.L. Secretion, surface localization, turnover and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. **Journal of Biology and Chemistry**, v.270, p.20410-20416, 1995.

THIMANN, K.V. "Auxins and the Growth of Roots". **American Journal of Botany**, v.23, n.8, p.561-569, 1936.

TONIOLLI, R. **Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation**. 1996. 91p. These de Doctorat (Docteur en Ciencias de la Vie) - Université François Rabelais de Tours, Tours, France, 1996. Resumo disponível em <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=182303>>.

TONIOLLI, R. Estudo das características *in vitro* do sêmen caprino de raças nativas do nordeste brasileiro, diluído em água de côco sob a forma *in natura*, estabilizada e de gel. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.15, p.133-137, 1989.

TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* do sêmen de suíno diluído na água de côco *in natura*, estabilizada e no diluidor BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, p.35-43, 1990.

TONIOLLI, R. A. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído na água de côco, estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.15, p.133-137, 1991.

WÁZQUEZ, I. Valoracion de acrosomas normales em células espermáticas de verraco. **Zootechnie**, v.29, p.507-512, 1980.

VERI, J.P.; HERMO, L.; ROBAIRE, B. Immunocytochemical localization of glutathione-S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis. **Journal of Andrology**, v.15, p.415-434, 1994.

VIJAYAKUMARAN, V.; NEELAKANTA IYER, C.P. Extender for preservation of boar semen. **Kerala Journal of Veterinary Science**, v.11, p.215-220, 1980.

WABERSKI, D. ***In vitro* and field insemination trials of stored boar semen with special reference to the semen diluente aditives BSA and buffers**. Thesis, Jannover, German Federal Republic, 87p., 1988.

WABERSKI, D.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; HAHN, R. Spermienmotilität und morphologie em ihrer Auswirkung auf die Fruchtbarkeit von Besamungsebern in feldversuchen. **Tierärztliche Praxis**, v.18, p.591-594, 1990.

WABERSKI, D.; MEDIN, S.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; WILMEN, T. **Fertility results of extender boar semen stored up to feve days – a comparison of dilution media**. In: XII International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. p.23-27, 1992.

WABERSKI, D.; GUILLEN, S.J.A.; BANDEIRA, A.E.; WEITZE, K.F. **Fertilizing capacity of spermatozoa related to the application of seminal plasma, the interval AI – ovulation and sperm number.** In: III International Conference of Boar Semen Preservation, Mariense, p.299, 1995. (abstract)

WEITZE, K.F. The use of “long-term extender” in pig A.I. – a view of the international situation. **Pig News Informations**, v.11, p.23-26, 1990.

WEITZE, K.J.; RATH, D.; ANDRADE MOURA, J.C.; PENA ALFARO, C.E. **Influence of seminal plasma constituents on sperm transport after insemination of deep frozen boar spermatozoa.** In: X International Congress of Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, p.314, 1988a.

WEITZE, K.J.; RATH, D.; PENA ALFARO, C.E.; ANDRADE MOURA, J.C.; SCHEID, I. **Influence of different sperm number and seminal plasma in the insemination upon number of accessory spermatozoa in pig embryos.** In: X International Congress of Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, p.313, 1988b.

WEITZE, K.J.; RATH, D.; WILLMEN, T.; WABERSKI, D.; LOTZ, J. Advancement of ovulation in the sow related to seminal plasma application before insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.25, p.61-67, 1990a.

WEITZE, K.J.; RABELAR, J.; WILLMEN, T.; WABERSKI, D. Interaction between inseminate, uterine and ovarian function in the sow. I. Influence of seminal plasma and oestrogens in the inseminate on intragenital sperm transport, time of ovulation and fertility results in gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.25, p.191-196, 1990b.

WEITZE, K.J.; RABELAR, J.; LOTZ, J.; WABERSKI, D.; WILLMEN, T. **The influence of seminal plasma and oestrogens in the inseminate on intragenital sperm transport, time of ovulation and fertilization results in gilts.** In: XI International Congress of Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, p.439, 1990c.

WEITZE, K.F.; WABERSKI, D.; WILLMAN, T. Seminal plasma plays an important part. Recent findings on sperm transport and ovulation in sows. **Tierärztliche**, v.42, p.342-344, 1990d.

WEITZE, K.J.; STAMPA, E.; RICHTER, L.; WILLMEN, T.; WABERSKI, D. Fertility of frozen boar semen: influence of packaging, number of inseminations and seminal plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, suppl.1, v.26, p.139-142, 1992.

WEKERLE, L. Laboratory examination of boar semen, with particular reference to sperm morphology. **Magyar Allatorvosok Lapja**, v.37, p.41-45, 1982.

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

WILLMEN, T. **Effect of number of spermatozoa and presence of seminal plasma in the inseminate on fertility rate, sperm transport and ovulation in pigs.** Thesis, Hannover, German Federal Republic, 96p., 1989.

WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G.; SELLEY, M.I.; SWAN, M.A. Effects of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.359-366, 1993.

YOGANATHAN, T.; ESKILD, W.; HANSSON, V. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.7, p.355-359, 1989.

ZAGORSKI, D.I.; IVANOVA, M.G.; BOBADOV, N.D. **Qualitative characteristics and morphology of boar spermatozoa after thawing in different diluents**. In: XII International Congress of Animal Reproduction, The Hague, p.1508-1510, 1992.

ZEUNER, A. On the relations between sperm-morphology and the fertility of boar semen. In: XII International Congress of Animal Reproduction, The Hague, p.1617-1619, 1992.

ZHOU, R.; SHI, B.; CHOU, K.C.K.; OSWALT, M.D.; HAUG, A. Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitating medium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.172, p.47-53, 1990.

Capítulo 2

Congelação e Conservação do Sêmen do Varrão

I. INTRODUÇÃO

Os primeiros trabalhos de congelação do sêmen do varrão foram realizados durante a década de 1950-1960. As taxas de espermatozoides móveis após a descongelação variavam entre 25 a 50%, segundo os autores e as técnicas utilizadas (ROY, 1955; POLGE, 1956; ROHLOFF, 1967). As porcentagens de partos obtidos eram bastante baixas, normalmente inferiores a 50%. Em 1970, Polge et al. demonstraram a possibilidade de obterem uma boa taxa de fertilidade com o uso do sêmen suíno, através do uso de uma técnica cirúrgica, na qual o sêmen era depositado diretamente no oviduto de marrãs no cio. Após os trabalhos de Polge et al. (1970), alguns autores (CRABO e EINARSSON, 1971; PURSEL e JOHNSON, 1971a), conseguiram através do uso da inseminação intra-cervical, obter resultados de fêmeas gestantes de até 80%. A técnica adotada utilizava uma fraca concentração final de glicerol (2 a 3%); um tempo de equilíbrio curto à temperatura de 5 °C e uma congelação do sêmen sobre gelo seco (gás carbônico) no formato de pastilhas. Entretanto, o número de porcas utilizadas nesses trabalhos foi pequeno ($n \leq 12$).

O início dos anos de 1970 foi marcado pelo aparecimento de numerosos métodos de congelação do sêmen do cachaço (CRABO e EINARSSON, 1971; PURSEL e JOHNSON, 1971a e 1971b; RICHTER e LIEDCKE, 1972; PAQUIGNON e du MESNIL du BOISSON, 1973). Nesse momento, o método de congelação na forma de pastilhas (NAGASE e NIWA, 1964), era o mais utilizado por todos os grupos de pesquisa da época. Por outro, a composição dos diluentes e o processamento do ejaculado variavam muito (LARSSON e EINARSSON, 1976a). Com o objetivo de melhorar os resultados de fertilidade, várias modificações foram feitas através da utilização de novos diluentes de congelação (EINARSSON et al., 1972; PURSEL e JOHNSON, 1975), do desenvolvimento de novos métodos de descongelação (PURSEL e JOHNSON, 1975) e também de um novo método de congelação (WESTENDORM et al., 1975).

Na sequência da evolução das técnicas de congelação, após a utilização da inseminação artificial cirúrgica no oviduto (POLGE et al., 1970), o desenvolvimento de um método de inseminação por via cervical, permitiu de aumentar a taxa de parto até 87% (PURSEL e JOHNSON, 1975; WESTENDORF et al., 1975). Assim, juntamente com os trabalhos de Paquignon et al. (1976), pode-se dizer que a técnica de congelação e descongelação do sêmen do varrão, tornou-se uma realidade. Entretanto, os resultados médios das inseminações com uso do sêmen congelado, se mostraram ainda muito baixos e o custo da utilização dessa técnica se mostrou muito elevado, para que a mesma pudesse ser utilizada em sistemas de rotinas pelos criadores.

O desenvolvimento de métodos laboratoriais visando a seleção de reprodutores cujo sêmen possa suportar os processos de congelamento/descongelamento, sem perda de seu poder fecundante, tornou-se necessário (LARSSON e EINARSSON, 1976a). A variação da resistência dos espermatozoides de diferentes machos à técnica ao processo de congelamento/descongelamento, é a razão de diferenças importantes de resultados de fertilidade entre reprodutores (LARSSON e EINARSSON, 1976b). Além do mais, em um determinado macho, certos ejaculados não suportam a congelamento e isso se traduz através de resultados de fertilidade muito baixos (LARSSON, 1976; LARSSON e EINARSSON, 1976b) em relação aos obtidos com sêmen refrigerado.

Os procedimentos de congelamento, descongelamento e inseminação, devem ser simples para permitir o sucesso da inseminação artificial, utilizando o sêmen congelado. Devido ao fato de apresentar uma variação dos resultados de fertilidade e de prolificidade, segundo o método de congelamento utilizado, uma dupla inseminação por fêmea se faz necessária (PAQUIGNON e COUROT, 1976). O número de espermatozoides que alcançam o local da fecundação do óvulo, é um fator importante para os resultados de fertilidade. Esse número depende em grande parte da sobrevivência e da motilidade dos espermatozoides dentro do trato genital da porca.

O estudo microscópico do acrossoma pode dar informações sobre a viabilidade dos espermatozoides, uma vez que suas alterações estão correlacionadas à motilidade espermática. Saacke e White (1972) demonstraram que a integridade acrossômica é importante para a capacidade de fecundação do espermatozoide, em bovinos. Alterações, induzidas por certos procedimentos técnicos de preparação, influenciam os resultados de fertilidade de alguns ejaculados, em particular aqueles utilizados em programas de inseminação artificial, nos quais a concentração espermática das doses inseminantes é diminuída.

O teste de termorresistência (avaliação do vigor espermático do sêmen incubado a 37 °C), é útil para a seleção de um diluente de descongelamento (LARSSON, 1976). Entretanto, um teste para indicar a integridade da membrana celular após a descongelamento pode ser útil para se avaliar a congelabilidade dos espermatozoides de cada reprodutor.

Vários autores, utilizando o sêmen congelado do varrão, demonstraram uma nítida influência do intervalo inseminação/ovulação, sobre os resultados de fertilidade (LARSSON, 1976; WABERSKI et al., 1994). Esta observação confirmou a importância do tempo de sobrevivência dos espermatozoides dentro das vias genitais da porca. Por essa razão, um bom controle do intervalo desmama/cio, da duração do cio e do momento de ovulação, na porca, é necessário para que a utilização do sêmen congelado possa apresentar melhores resultados (WEITZ, 1995; WEITZ et al., 1993, 1994 e 1995).

Levando-se em conta esses diversos aspectos, a parte desse trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade da auxina (ácido 3-indol acético - IAA) proteger os espermatozoides do varrão, durante o processo de congelamento/descongelamento do sêmen.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. 1. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CONGELADO: ESTUDO *IN VITRO*

Os métodos e técnicas utilizadas para a condução dos animais e as coletas de sêmen são as mesmas descritas para o uso do sêmen refrigerado. O teste de termorresistência é feito aos cinco minutos e duas horas de incubação do sêmen em banho maria a 37 °C, ao invés de 3 horas como é feito com o sêmen refrigerado. Com o tempo de incubação de 3 horas, os espermatozoides descongelados estavam mortos em 90% das amostras testadas. Um total de 10 varrões foram coletados duas vezes por semana, cada um (segunda e quinta feira). A mudança da frequência de coletas semanais, de uma para duas vezes, foi feita duas semanas antes do início dos trabalhos. Somente os ejaculados obtidos das coletas de quinta feira, foram utilizados. O esquema de duas coletas por semana, foi escolhido segundo o método desenvolvido por Paquignon e Courot (1975). Esses autores demonstraram que se trabalhando dessa forma, a taxa de espermatozoides reanimados após a descongelação é significativamente mais elevada.

Um primeiro experimento permitiu se determinar a melhor temperatura de adição do IAA dentro do diluente de congelação com gema de ovo, durante o processo de abaixamento da temperatura (adição do IAA a 30 °C e a 15 °C). Em um segundo momento, foram testadas duas concentrações de IAA (10 e 100ng/mL), adicionado à temperatura de 30 °C antes da congelação, e dentro do diluente de descongelação.

01. Técnica de congelação

O sêmen é congelado, a partir de ejaculados divididos segundo o protocolo de congelação proposto, com um total de 10×10^9 sptz em um volume de 20mL. Cada dose preparada de sêmen é descongelada e controlada (vigor e porcentagem de espermatozoides móveis). Apenas as doses apresentando ao menos 25% de células móveis e 2,5 de vigor espermático, foram utilizadas para as inseminações artificiais. Esse procedimento teve por objetivo, obter doses inseminantes com pelo menos $2,5 \times 10^9$ sptz móveis para ser usada nas inseminações de cada lote experimental, proporcionando uma maior homogeneidade da qualidade do sêmen entre os diferentes tratamentos.

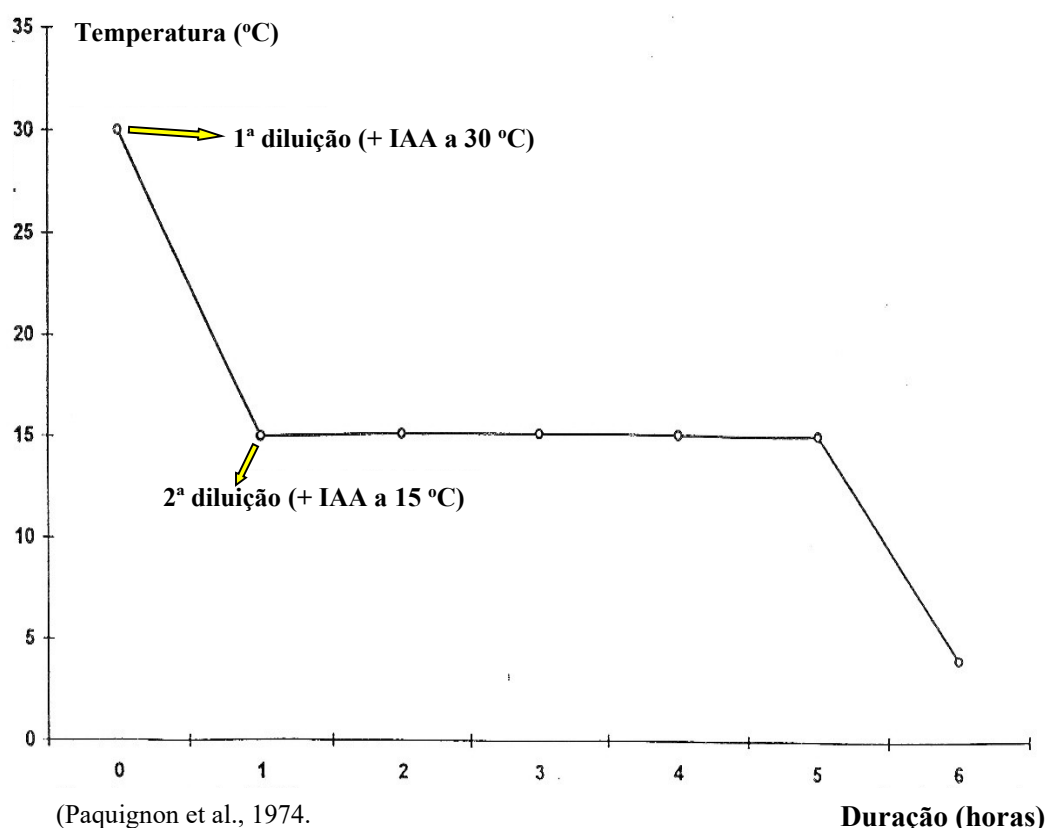
O sêmen é congelado segundo o método de Paquignon et al. (1974). O diluente de congelação é constituído de 5,67g de glicose e 22,5% de gema de ovo em um total de 100mL de água destilada (POLGE et al., 1970). Em um primeiro momento, após a coleta, o volume de sêmen equivalente a um total de 10×10^9 sptz, é destinado a cada um dos tratamentos de congelação (com ou sem IAA), com o intuito de se formar uma dose inseminante final com uma concentração de 100×10^6 sptz/mL. Em seguida, o plasma seminal é eliminado através de centrifugação do sêmen a uma velocidade de 800g, durante 15 minutos a 30 °C. O sobrenadante é descartado, e a papa de espermatozoides restante, ocupa um volume de 2mL. Uma primeira diluição (pré-diluição – diluente de resfriamento) é feita pela adição, à papa de espermatozoides, o diluente glicose/gema de

ovo a 30 °C + 2mL da “papa” de espermatozoides + 9mL do diluente, formando assim módulos com um volume total de 11mL.

A partir desse ponto, a temperatura é abaixada progressivamente durante um período de 1 hora, até 15 °C. Após esse tempo, uma segunda diluição é realizada (diluição final, diluente de congelamento), adicionando-se 9mL do diluente glicose/gema de ovo/glicerol (4%), à temperatura de 15 °C. Esse procedimento é feito dentro de cada amostra, que foram mantidas por 4 horas a essa temperatura (tempo de equilíbrio). A concentração final do glicerol é de 2% dentro de cada tratamento do sêmen a ser congelado (POLGE et al., 1970), em cada módulo final com um volume de 20mL.

Ao final desse período de equilíbrio, a temperatura é progressivamente abaixada até 4 °C durante 1 hora (Figura 11). O sêmen é então pipetado visando sua congelação sobre gelo seco (gás carbônico), à temperatura de -70 °C, depositando-se em cima do gelo seco, em pequenos sulcos, gotas de sêmen de 0,1mL em formato de pastilhas (50×10^6 sptz). Após 4 minutos sobre o gelo seco, as pastilhas são transferidas diretamente para o nitrogênio líquido, onde são conservadas durante sete dias. Cada tratamento possui um total de 200 pastilhas de 0,1mL cada; algumas são separadas visando as análises de motilidade e avaliação da taxa de espermatozoides vivos. Dessa forma se determina a possibilidade de utilizar pastilhas restantes na inseminação artificial. Amostras de sêmen, são separadas para as análises *in vitro*, logo após a congelação das pastilhas.

Figura 11: Curva de resfriamento do sêmen do varrão antes da congelação, momentos e temperaturas de adição do IAA.



02. Decongelação e controles

Visando a descongelação e análises *in vitro*, quatro pastilhas (0,4mL) foram colocadas dentro de um tubo de ensaio contendo 1,6mL de diluente a 50 °C durante 30 segundos. Dessa forma, a proporção de 1/5 para a diluição do sêmen é respeitada.

Para cada inseminação, as 200 pastilhas (20mL) são descongeladas dentro de 80mL do diluente BTS, adicionado ou não do IAA, a uma concentração de 100ng/mL, e misturadas lentamente com um bastão de vidro. Assim, elas são diluídas na proporção de 1/5, segundo a técnica de diluição da dose de sêmen congelado descrita por Paquignon e du Mesnil du Buisson (1973). Cada dose de sêmen foi descongelada na Estação de Inseminação Artificial de Rouillé (INRA, França), em seguida transportada em caixa climatizada para uma granja, à uma distância de 11km do laboratório, onde foram feitas as inseminações artificiais. O tempo decorrido entre a descongelação do sêmen e a inseminação artificial, foi sempre inferior a 60 minutos.

03. Escolha do momento de adição do IAA antes da congelação

Em um experimento preliminar (nº 1 - Tabela 14), foi comparado os efeitos do IAA em função da temperatura de sua adição durante o processo de resfriamento do sêmen. O IAA foi adicionado ao diluente à base de gema de ovo à concentração final de 10ng/mL, em dois momentos diferentes: 1) adicionado à temperatura de 30 °C; 2) adicionado à temperatura de 15 °C (início do período de equilíbrio). Nos dois casos, a descongelação foi feita dentro do diluente BTS, adicionado ou não do IAA.

Tabela 14: Concentrações e temperaturas de adição do IAA segundo os experimentos (1 e 2) e os diferentes tratamentos.

Experimentos	Concentração IAA	Temperatura de adição do IAA	Lotes	Concentração IAA
1 (Preliminar)	10ng/mL	Somente a 15 °C	1	10/0
		15 °C e descongelação	2	10/10
		Somente a 30 °C	3	10/0
		30 °C e descongelação	4	10/10
	0ng/mL	Controle (sem IAA)	1	0/0
2	10ng/mL	Somente descongelação	2	0/10
		Somente a 30 °C	3	10/0
		30 °C e descongelação	4	10/10
	100ng/mL	Somente descongelação	5	0/100
		Somente a 30 °C	6	100/0
		30 °C e descongelação	7	100/10

04. Escolha das diferentes concentrações de IAA

No experimento (nº 2 - Tabela 14), o IAA foi testado em duas diferentes concentrações finais: 10 e 100ng/mL. À luz dos resultados do experimento nº 1

(preliminar), optou-se pela temperatura de 30 °C, para a adição do IAA ao diluente, durante o período de resfriamento do sêmen.

05. Mobilidade e morfologia espermática após descongelação

O vigor e a porcentagem de espermatozoides móveis foram avaliados após 5 minutos e 2 horas de incubação do sêmen a 39 °C. A avaliação dessas características foi feita à luz da microscopia óptica em contraste de fase, em um aumento de 130x. O diluente de descongelação utilizado foi o BTS, dentro do qual foi adicionado ou não o IAA, logo após a descongelação.

A análise morfológica foi realizada a 5 minutos de incubação do sêmen após a descongelação, em esfregaços de sêmen (espermatozoides) segundo as técnicas de coloração e classificação utilizadas para o sêmen refrigerado.

II. 2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM MARRÃS APÓS CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CONGELADO

01. Concentração do IAA e formação dos lotes experimentais

A adição do IAA no diluente de congelamento (gema de ovo), foi feita à temperatura de 30 °C e/ou no diluente de descongelação (BTS), à uma concentração final de 100ng/mL. Um total de quatro lotes experimentais, com 27 fêmeas cada um, foram formados segundo a presença ou ausência do IAA no meio diluente (Tabela 15).

Tabela 15: Momentos de adição (30 °C e/ou descongelação) do IAA (100ng/mL) de acordo com os diferentes tratamentos (n=27).

Tratamentos	Diluentes	Explicação
1	0 / 0	Controle
2	0 / 100	Adição do IAA na descongelação
3	100 / 0	Adição do IAA a 30 °C
4	100 / 100	Adição de IAA 30 °C e na descongelação

02. Sincronização do cio das marrãs

Foram utilizadas marrãs púberes com idades variando entre 8 a 10 meses, submetidas à um tratamento de sincronização de cio (*Regumate*) durante 18 dias, de forma que os cios da maior parte das fêmeas fossem agrupados (MARTINAT-BOTTÉ et al., 1995). O *regumate* tem uma ação fisiológica análoga à da progesterona: ele bloqueia as descargas cíclicas dos hormônios gonadotróficos hipofisários, impedindo assim o aparecimento do cio. Após a parada do tratamento, os cios são agrupados entre o quinto e oitavo dia.

Para permitir uma aplicação uniforme do medicamento para todas as marrãs, o produto, em solução oleosa a 4%, é administrado todos os dias na ração dos animais no volume de 5mL por dia e por marrã; o tratamento começa na segunda feira e as fêmeas são agrupadas em lotes de cinco fêmeas. Visando o controle do aparecimento do cio, o

último dia da aplicação do *regumate* (18º dia) é considerado o dia zero D0 (quinta feira); o dia seguinte é o dia D1 (sexta feira) e assim na sequência.

03. Coletas de sangue e dosagens hormonais

Teve por finalidade avaliar a concentração da progesterona no plasma sanguíneo, visando uma dedução do momento da ovulação. Após o final do tratamento (*regumate*), as amostras sanguíneas são retiradas a partir do D4 (segunda feira de manhã) até 48 horas após a parada dos sintomas de cio (após de 2 dias de respostas negativas ao controle de cio). As coletas de sangue são feitas duas vezes por dia (8:30 horas e 17 horas). Um volume de 5mL é coletado, e após 10 minutos de centrifugação a 2200G o sobrenadante é retirado e congelado a -20 °C até o momento das dosagens.

A progesterona foi dosada pelo método radioimunológicos (RIA) (SAUMANDE et al., 1985) no laboratório de dosagens hormonal da Estação de Fisiologia dos Mamíferos Domésticos (INRA – Nouzilly, França). Cada amostra de sangue foi dosada em duplicidade e os valores médios foram considerados para expressar a concentração plasmática da progesterona. O início da ovulação, estimado pelo perfil hormonal das concentrações de progesterona no plasma sanguíneo, é considerado no início do aumento da progesterona (1º ponto acima da linha de base) (MARTINA-BOTTÉ et al., 1995).

04. Inseminação artificial

Cada fêmea no cio foi inseminada duas vezes por cio, em um intervalo de 12 horas, com uma dose de sêmen de 10×10^9 sptz. As duas doses são provenientes do mesmo varrão e do mesmo lote experimental. Em 80% dos casos, as duas doses de inseminação foram provenientes do mesmo ejaculado. As inseminações foram feitas 24 horas após o início do cio, segundo o esquema abaixo:

a) Primeiro caso: Início do cio pela manhã (8:30 horas), a inseminação é feita no dia seguinte pela manhã (1ª) e final da tarde (17:30 horas, 2ª).

b) Segundo caso: Início do cio final da tarde (17:30 horas), a inseminação é feita no dia seguinte pela tarde (1ª) e de manhã do segundo dia (18 horas, 2ª).

	noite	manhã	noite	manhã	noite	manhã
1º caso	-	+	+	1ª IA	2ª IA	
2º caso	-	-	+	+	1ª IA	2ª IA

Se uma série de cios duvidosos ($\pm$) se mostram antes do cio positivo (+), o último cio duvidoso ($\pm$) é levado em consideração como o início do estro, assim:

	noite	manhã	noite	manhã	noite	manhã
1º caso	-	$\pm$	+	1ª IA	2ª IA	
	$\pm$	$\pm$	+	1ª IA	2ª IA	
2º caso	-	-	$\pm$	+	1ª IA	2ª IA
	-	$\pm$	$\pm$	+	1ª IA	2ª IA

Antes de cada inseminação artificial (1ª e 2ª), as marrãs recebiam uma dose com volume de 50mL, de plasma seminal por inseminação, utilizando a mesma pipeta por onde seria posteriormente colocado o sêmen. Segundo os resultados de vários autores (BURTGANS, 1982; WEITZE et al., 1988a e 1988b), esse procedimento melhora as taxas de motilidade dos espermatozoides do varrão, dentro do oviduto da porca, bem como as taxas de fertilidade.

05. Ecografia e análises após o abate das marrãs

Foram feitos dois exames ecográficos por marrã, o primeiro aos 21 dias e o segundo aos 30 dias, após a primeira inseminação. As fêmeas que retornavam ao cio foram descartadas do experimento, mas são consideradas para os cálculos dos resultados de fertilidade, onde são consideradas como fêmeas vazias (resultado negativo). Para a verificação dos resultados de fertilidade e prolificidade, as fêmeas cujos resultados na segunda ecografia foram positivos, foram sacrificadas entre 30 e 35 dias de gestação para a contagem dos embriões e controle dos corpos lúteos nos ovários.

A mortalidade embrionária e mensurada pela relação entre o número total de corpos lúteos nos ovários e o número de embriões vivos aos 30/35 dias de gestação. O tamanho dos embriões foi mensurado por seu comprimento, da cabeça a base da cauda (centímetros) e seu peso (gramas).

III. RESULTADOS

III. 1. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CONGELADO: ESTUDO *IN VITRO*

01. Momento da adição do IAA antes da congelação (experimento nº 1)

No experimento nº 1 (Tabela 16) foi procurada qual o melhor momento de adição do IAA (a 30 ou 15 °C), durante o processo de resfriamento do sêmen, antes da congelação. Nesse experimento, não houve variação da concentração testada do IAA, se mantendo sempre em 10ng/mL. Globalmente os melhores resultados de vigor espermático, a cinco minutos de incubação do sêmen, foram obtidos quando o IAA foi adicionado no diluente de congelação à temperatura de 30 °C. Um resultado equivalente foi igualmente encontrado à temperatura de 15 °C, mas na condição de que o IAA fosse também adicionado no diluente de descongelação. O valor mais fraco do vigor foi encontrado quando a adição do IAA foi feita apenas à temperatura de 15 °C, durante o processo de abaixamento da temperatura (2,3±0,4). Após duas horas de incubação a 39 °C, os melhores resultados do vigor espermático foram sempre observados quando o IAA foi adicionado a 30 °C. Esses resultados foram significativamente diferentes daqueles obtidos a 15 °C ($p<0,05$).

Tabela 16: Efeito do momento de adição do IAA (10ng/mL) antes da congelação, sobre as características da mobilidade espermática do sêmen do varrão após incubação a 39 °C, por 5 minutos e 2 horas (**experimento nº 01**). (m $\pm$ sd)

Lotes	Temp	IAA (ng/mL) Descongelação	(n)	Vigor espermático		Motilidade espermática	
				Tempo incubação		após descongelação	
				5min	2h	5min	2h
1	15 °C	0	20	2,3 $\pm$ 0,4 ^a	1,3 $\pm$ 0,8 ^a	28,8 $\pm$ 0,4 ^a	10,8 $\pm$ 9,2 ^a
2	15 °C	10		2,6 $\pm$ 0,5 ^b	1,3 $\pm$ 0,8 ^a	33,0 $\pm$ 0,4 ^a	12,5 $\pm$ 11,8 ^{ab}
3	30 °C	0	107	2,5 $\pm$ 0,4 ^b	1,8 $\pm$ 0,8 ^b	29,3 $\pm$ 0,4 ^a	16,8 $\pm$ 9,9 ^b
4	30 °C	10		2,3 $\pm$ 0,4 ^b	1,9 $\pm$ 0,8 ^b	30,4 $\pm$ 0,4 ^a	17,4 $\pm$ 10,3 ^b

Obs.: As diferenças entre tratamentos (lotes) são expressas por letras diferentes dentro de cada tempo de incubação.

Após 5 minutos de incubação, a porcentagem de espermatozoides móveis não foi significativamente influenciada pela adição do IAA, nem a 15 °C, nem a 30 °C. Por outro lado, após duas horas, os resultados foram significativamente menores quando o IAA foi adicionado a 15 °C do que a 30 °C, durante o processo de abaixamento da temperatura (10,8 $\pm$ 9,2 vs 16,8 $\pm$ 9,9) ($p < 0,05$). Os melhores resultados da motilidade espermática, foram obtidos no tratamento 3 (16,8 $\pm$ 9,9) e no tratamento 4 (17,4 $\pm$ 10,3), nos quais o IAA foi adicionado na primeira etapa do processo (30 °C) e também no diluente de descongelação.

De uma forma geral, para as duas características estudadas, os melhores resultados foram observados nos tratamentos nos quais, a adição do IAA foi feita já no início do processo, a 30 °C, e também na descongelação. Os resultados após duas horas de incubação, sugerem que um contato prolongado dos espermatozoides com o IAA, reduz a queda da mobilidade espermática. **Por estas razões foi escolhido, na sequência desse trabalho, adicionar o IAA no diluente de congelação, a 30 °C, desde o início do processo de resfriamento do sêmen.**

02. Concentração do IAA (experimento nº 2)

O experimento nº 2 (Tabela 17) teve por finalidade determinar a concentração de IAA, que tivesse a ação mais favorável para as características de mobilidade espermática.

Aos 5 minutos de incubação, foi visto diferenças significativas de vigor espermático entre as duas concentrações de IAA, em qualquer momento de sua adição ao sêmen: A concentração de 100ng/mL foi significativamente melhor do que a de 10ng/mL (2,7 vs 2,5, respectivamente, $p < 0,05$). A adição do IAA somente após a descongelação, mostrou que, em relação ao lote controle (0/0), a diferença foi um pouco mais acentuada (2,7 vs 2,3, $p < 0,05$). O papel favorável do IAA, na concentração de 100ng/mL, foi particularmente marcante, após 2 horas de incubação a 39 °C ($p < 0,05$). Essa concentração de IAA reduziu significativamente a queda da motilidade espermática em relação as de 0 ou 10ng/mL, durante o tempo de incubação do sêmen.

Tabela 17: Efeito da dose e do momento de adição do IAA (10 e 100ng/mL) sobre as características da mobilidade espermática do sêmen congelado do varrão (**experimento nº 02**) ($m \pm sd$)

Lotes	IAA (ng/mL)	Ejaculados (n)	Vigor espermático		Motilidade espermática	
			Tempo de Incubação			
			5min	2h	5min	2h
1	0/0	107	2,3±0,4 ^a	1,7±0,8 ^a	26,2±8,0 ^a	14,6±9,4 ^a
2	0/10	75	2,5±0,4 ^b	1,7±0,7 ^a	30,3±7,4 ^b	15,5±9, ^{ab}
3	10/0	107	2,5±0,4 ^b	1,8±0,8 ^a	29,3±7,4 ^b	16,8±9,9 ^b
4	10/10	107	2,5±0,5 ^b	1,9±0,8 ^a	30,4±7,1 ^b	17,4±10,3 ^b
5	0/100	32	2,7±0,4 ^c	2,4±0,5 ^b	29,5±5,4 ^b	22,2±6,5 ^c
6	100/0	62	2,6±0,4 ^{bc}	2,3±0,8 ^b	28,9±5,9 ^b	23,9±7,2 ^c
7	100/100	62	2,7±0,5 ^c	2,3±0,5 ^b	29,8±6,2 ^b	24,5±6,5 ^c

Obs.: O significado das diferenças entre tratamentos (lotes) está expressa por letras diferentes dentro de cada tempo de incubação.

Lote 1 (0/0) = Sem adição de IAA;

Lote 2 (0/10) = IAA (10ng/mL) no diluente de descongelação;

Lote 3 (10/0) = IAA (10ng/mL) 30 °C antes da congelação;

Lote 4 (10/10) = IAA (10ng/mL) antes da congelação e no diluente de descongelação;

Lote 5 (0/100) = IAA (100ng/mL) no diluente de descongelação;

Lote 6 (100/0) = IAA (100ng/mL) a 30 °C antes da congelação;

Lote 7 (100/100) = IAA (100ng/mL) antes da congelação e no diluente de descongelação.

Com relação à porcentagem de espermatozoides móveis, nos dois tempos de incubação, os valores do tratamento controle, foram inferiores em relação aos obtidos na presença do IAA no meio de diluição. As diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Para os dois tratamentos com IAA, houve uma equivalência de valores aos 5 minutos de incubação, entretanto, após duas horas, a concentração de 100ng/mL, permitiu uma melhor manutenção da porcentagem de espermatozoides móveis ($p < 0,05$).

Quando da adição do IAA (100ng/mL) antes e após a congelação, foram obtidos os melhores resultados de vigor e motilidade espermática. Isso foi particularmente observado após as 2 horas de incubação do sêmen. Houve uma interação entre o diluente e o tempo de incubação, no tratamento 7 (100/100) onde a queda dos valores foi menos importante.

Os resultados da análise de variância mostraram que as variações totais do vigor espermático (25%) e da motilidade espermática (35%), podem ser explicados pelos efeitos dos diluentes (antes a congelação e após a descongelação), pelo tempo de incubação e as interações duplas e triplas. Os restantes 75% e 65%, respectivamente, foram devido a fatores não controlados e à sorte da amostragem.

03. Morfologia espermática

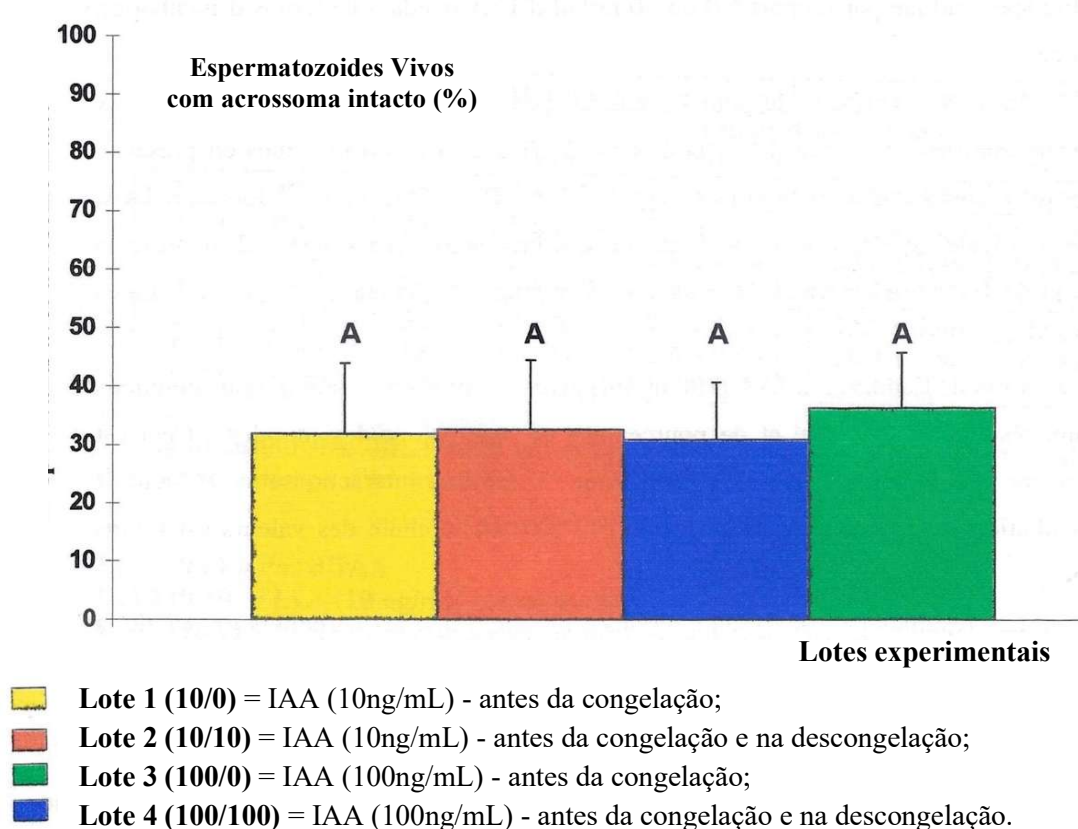
Em um primeiro teste, duas concentrações de IAA (10 e 100ng/mL) adicionadas ao diluente a 30 °C e no momento da descongelação, foram comparadas para se estudar a ação da auxina sobre a morfologia espermática. Na sequência, a ação do IAA

(100ng/mL) foi testada em relação ao tratamento controle, na ausência total deste composto (0/0).

3.1. Efeito das concentrações de IAA sobre a morfologia espermática

Não houve diferenças entre a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto, em qualquer que seja a concentração utilizada ou o momento de sua adição ao diluente (antes da congelação e/ou no momento da descongelação) (Figura 12). Entretanto, os resultados médios foram ligeiramente superiores quando o IAA foi adicionado em dois momentos, antes da congelação e no momento da descongelação. Por outro lado, as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Figura 12: Ação do IAA, nas concentrações de 10 e 100ng/mL, sobre a morfologia dos espermatozoides do varrão, avaliada após a descongelação.



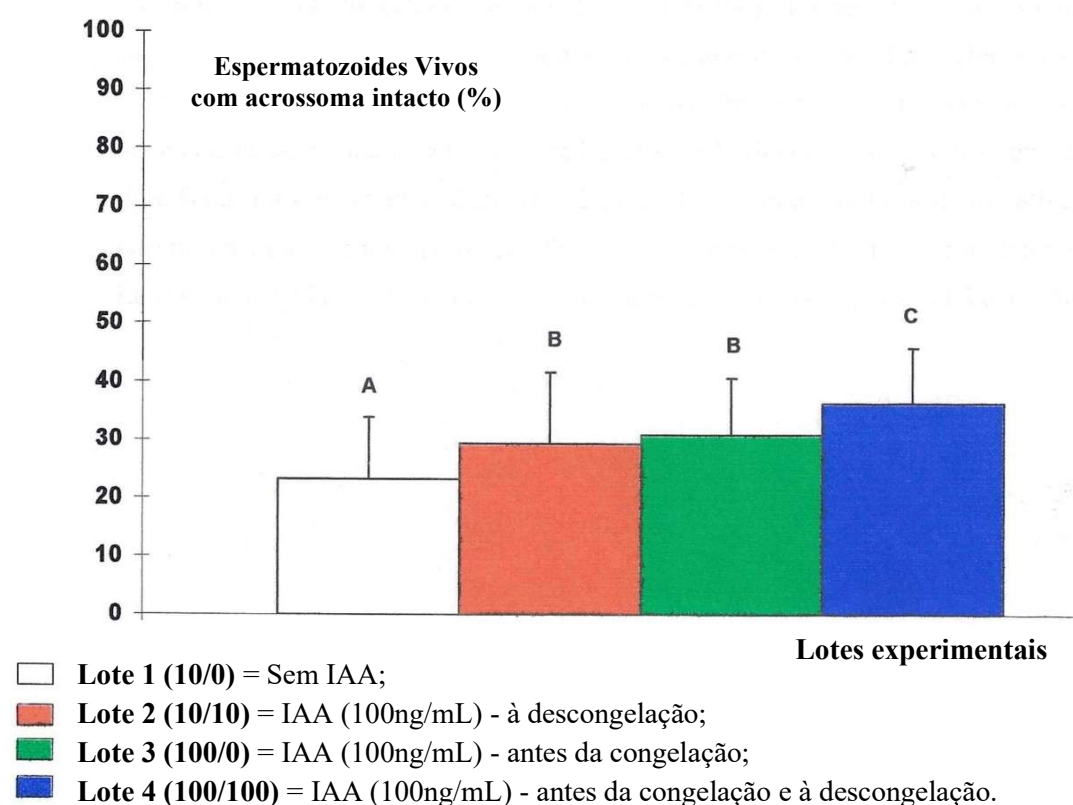
Obs.: As diferenças entre os valores médios, não foram significativas (letras iguais, acima das diferentes colunas).

3.2. Adição do IAA (100ng/mL) ao BTS: ação sobre a morfologia

O IAA apresentou um efeito favorável e significativo sobre a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto (lotes 2, 3 e 4 vs lote 1). Em particular quando o IAA foi adicionado antes da congelação e na descongelação (100/100), os resultados foram significativamente melhores aos do tratamento onde o IAA foi adicionado apenas em uma dessas etapas (lote 4 vs lotes, 2 e 3) ($p<0,05$). Esses resultados traduzem uma melhoria significativa do número de espermatozoides vivos com acrossoma intacto. Quando o IAA foi adicionado somente antes da congelação (lote 3)

ou somente na descongelação (lote 2), as diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Entretanto, os dois tratamentos foram significativamente melhores em relação ao tratamento controle BTS (0/0). O BTS sozinho, sem nenhuma adição outra substância, utilizado como diluente na descongelação apresentou resultados inferiores quando foi utilizado o BTS adicionado do IAA (Figura 13).

Figura 13: Ação do IAA (100ng/mL), adicionado ou não ao diluente BTS, sobre a morfologia dos espermatozoides do varrão, avaliada após a descongelação.



Obs.: Letras diferenças acima das diferentes colunas indicam que os resultados foram significativamente diferentes ($p<0,05$).

III. 2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM MARRÃS UTILIZANDO O SÊMEN NA FORMA CONGELADA

01. Duração do estro e do momento de ovulação

Na tabela 18, a duração do estro variou de 20 a mais de 95 horas. Entretanto, 90,2% das marrãs se encontraram dentro de um intervalo de duração de estro de 35 a 79 horas. Entre elas, a maioria das fêmeas (72,5%) tiveram uma duração do estro compreendida entre 35 e 64 horas. O momento do início das ovulações é determinado em relação ao início dos sinais do estro. A maior parte das ovulações (72,9%) se encontraram entre 35 e 64 horas após o início do estro, entretanto, algumas ovulações foram identificadas entre 30 e 34 horas (18,5%) e entre 65 e 94 horas (806%). Todas as marrãs ovularam antes de 95 horas após o início do estro.

Tabela 18: Avaliação da duração do estro e do momento de ovulação de marrãs, entre 20 horas e mais de 95 horas, a partir do início do cio.

Intervalos (horas)	20 a 30	35 a 49	50 a 64	65 a 79	80 a 94	≥95
Duração estro	1 (1,2)	27 (33,3)	26 (32,1)	20(24,7)	5 (6,2)	6 (2,5)
Nº de marrãs (%)						
Momento ovulação (*)	15 (18,5)	28 (34,6)	32 (38,3)	5 (7,4)	1 (1,2)	0 (0,0)
Nº de marrãs (%)						

Obs.: (*) Valor computado através da identificação do primeiro ponto da subida das concentrações plasmáticas da progesterona.

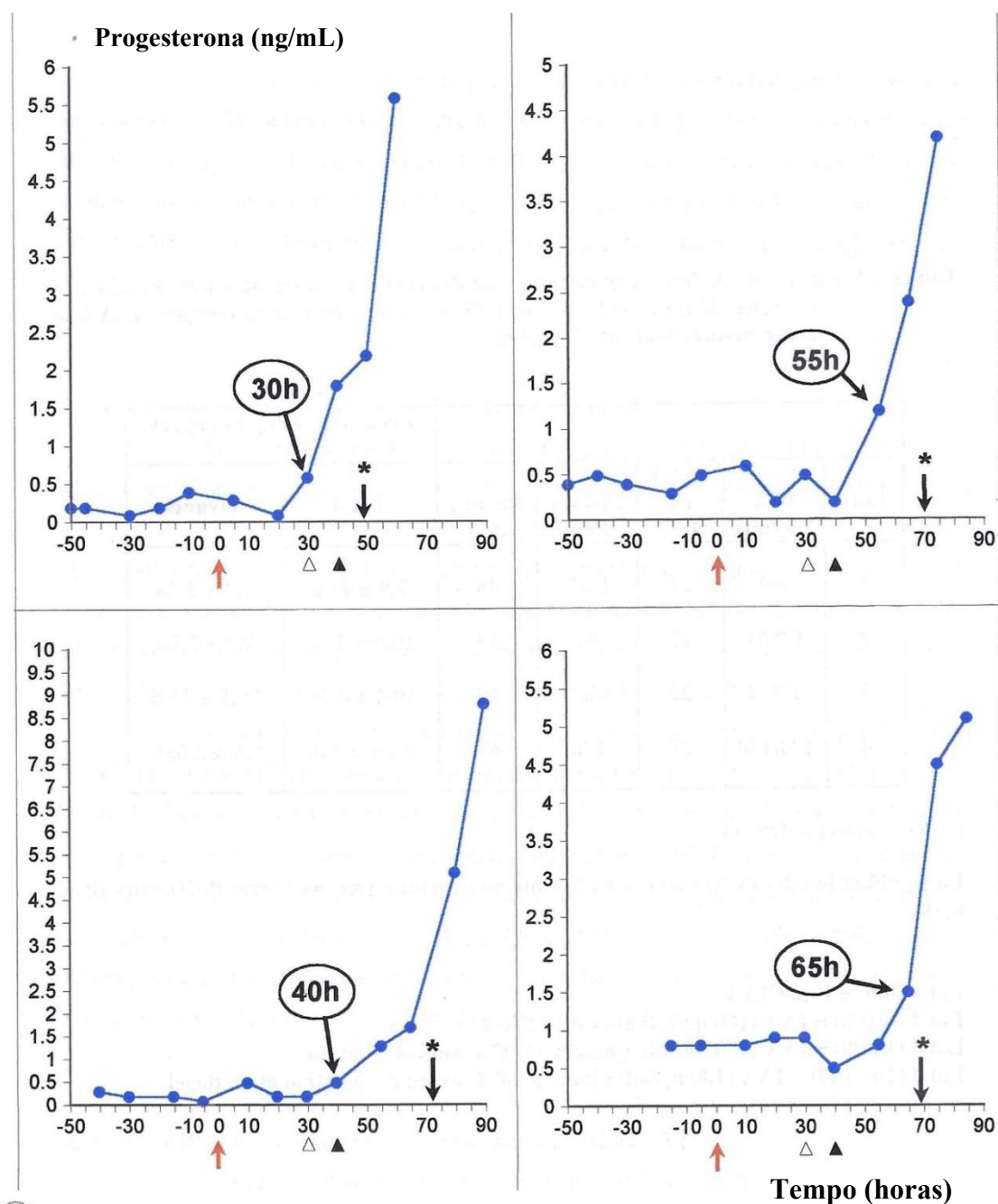
Na tabela 19, verifica-se que a repartição dos lotes de inseminação, se apresentam de maneira relativamente homogênea dentro de cada intervalo de duração do estro e do momento da ovulação. As diferenças foram mínimas e a repartição equilibrada entre os diferentes lotes com uma influência muito fraca sobre os resultados de fertilidade.

Tabela 19: Distribuição da duração do estro e do momento de ovulação entre os diferentes tratamentos (lotes) (n = 81).

Intervalos (horas)		20 a 30	35 a 49	50 a 64	65 a 79	80 a 94	≥95
Fêmeas (%)	Lotes	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Duração do estro	(1) 0/0	*-	7,4	8,7	4,9	3,7	1,2
	(2) 0/100	*-	7,4	6,2	8,7	1,2	1,2
	(3) 100/0	1,2	12,3	8,7	4,9	*-	*-
	(4) 100/100	*-	6,2	8,7	6,2	1,2	*-
Fêmeas (%)	Lotes	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ovulação em relação ao início estro	(1) 0/0	4,9	8,6	11,1	1,2	*-	*-
	(2) 0/100	4,9	7,4	8,6	2,5	1,2	*-
	(3) 100/0	6,3	11,1	9,9	*-	*-	*-
	(4) 100/100	2,5	7,4	9,9	2,5	*-	*-

A Figura 14, mostra uma variação do momento de ovulação em relação ao início do estro em quatro exemplos de fêmeas inseminadas. As concentrações base da progesterona se situaram entre 0,5 e 1,0ng/mL, e permitiram identificar o início do pico plasmático que caracteriza o início da ovulação, o qual se situou entre 30 e 65 horas após o início do estro.

Figura 14: Exemplos de variações da concentração da progesterona plasmática, em quatro marrãs, na avaliação do momento do estro.



02. Fertilidade e prolificidade, resultados gerais

A adição do IAA, ao diluente gema de ovo, a 30 °C (100/0), durante o processo de congelamento, não trouxe nenhuma melhoria dos resultados de fertilidade em relação ao controle (0/0) (48%, nos dois casos, $p>0,05$). Quando o IAA foi adicionado

somente na descongelção (0/100), a porcentagem de partos foi mais baixa (33%) e as diferenças não significativas ($p>0,05$). A maior porcentagem de marrãs gestantes foi obtida quando o IAA foi adicionado antes da congelção (30 °C) e no momento da descongelção (100/100). Nesse tratamento foi obtida uma taxa de fertilidade com 17 fêmeas gestantes (63%) em um total de 27 marrãs. Entretanto, essa diferença em relação ao tratamento controle (0/0) não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), em razão do baixo número de animais inseminados (Tabela 20).

Tabela 20: Resultados de fertilidade e prolificidade de marrãs inseminadas com sêmen congelado, adicionado ou não do composto IAA na concentração de 100ng/mL ($n = 27$).

Lotes	IAA (ng/mL)	Gestantes (Nb)	Gestantes (%)	Prolificidade*/30 dias após a I.A.	
				Total	Vivos
1	0/0	13 ^{ab}	48	7,9±4,0 ^a	7,4±3,5 ^a
2	0/100	9 ^a	33	10,0±3,0 ^b	9,3±2,7 ^b
3	100/0	13 ^{ab}	18	10,4±4,3 ^b	10,1±2,8 ^b
4	100/100	17 ^a	63	9,1±3,6 ^{ab}	8,8±3,6 ^{ab}

Obs.: a diferença entre lotes é expressa por letras sobscritas diferentes ($p<0,05$).

(*) Embriões/fêmea.

Lote 1 (10/0) = Sem IAA;

Lote 2 (0/100) = IAA (100ng/mL) + à descongelção;

Lote 3 (100/0) = IAA (100 ng/mL) + a 30 °C antes da congelção;

Lote 4 (100/100) = IAA (100ng/mL) + a 30 °C antes da congelção e à descongelção.

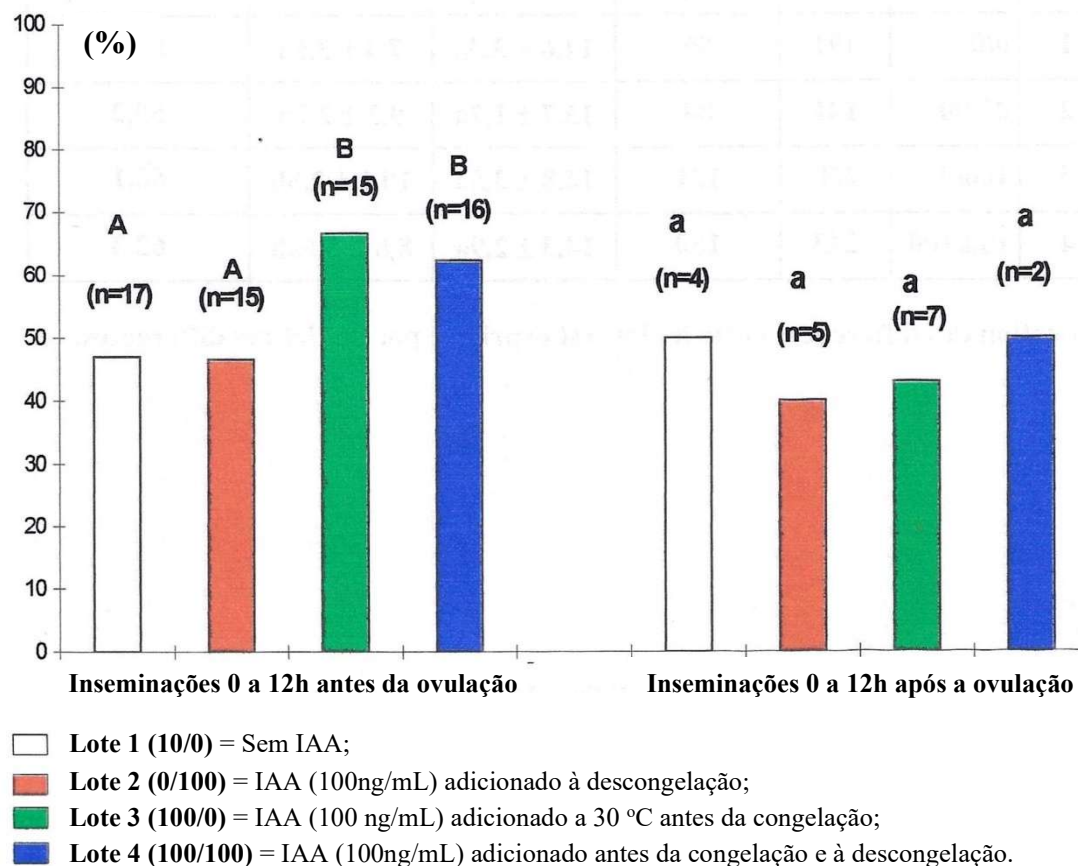
A avaliação da porcentagem de embriões vivos por fêmea, permitiu verificar que o tratamento controle (0/0) apresentou o resultado médio mais baixo (7,4 embriões por fêmea). Com a adição do IAA, a 30 °C, na descongelção ou nesses dois momentos, o número de embriões vivos melhorou (9,3, 10,1 e 8,8 embriões por fêmea, respectivamente; $p<0,05$). Essa tendência foi também verificada para o resultado do número total de embriões por fêmea (vivos e mortos) ($p<0,05$).

03. Fertilidade em relação ao momento de ovulação

As inseminações foram feitas dentro de um período médio de 12 horas antes ou depois da ovulação. Os melhores resultados de fertilidade foram observados quando as inseminações aconteceram antes da ovulação, em particular na presença do IAA no meio de diluição do sêmen (lote 100/0 = 66,7% e o lote 100/100 = 62,5%). O momento da inseminação em relação ao da ovulação demonstrou ter uma grande importância para a obtenção de taxas de fertilidade mais elevadas. É importante se observar que as taxas dos resultados negativos aumentaram significativamente quando as inseminações foram feitas após a liberação do ovócito ($p>0,05$). Após o controle de um total de 81 fêmeas, verificou-se que a adição do IAA ao diluente BTS apresentou vantagens em relação aos

resultados de fertilidade ($p < 0,05$), quando as inseminações foram realizadas antes da ovulação (Figura 15).

Figura 15: Relação (%) dos resultados das inseminações artificiais em função do momento de ovulação (± 12 horas), com sêmen congelado do varrão.



Obs.: Letras diferentes, diferenças significativas entre médias. Teste estatístico = χ^2

Entretanto, foi necessário adicionar o IAA ao menos a 30 °C, durante o abaixamento da temperatura visando a congelação do sêmen, para que esse efeito possa ser evidente. Quando o IAA foi adicionado apenas no momento da descongelação (0/100), os resultados ficaram semelhantes aos obtidos com o lote controle (0/0; 46,7% e 47,0%, respectivamente. $p > 0,05$). O efeito benéfico do IAA, adicionado ao diluente de congelação e/ou à descongelação (BTS), não foi mais significativo do que quando as inseminações foram feitas após a ovulação.

04. Número de embriões vivos por corpos lúteos

Após o tratamento de *Régumate* (sincronização de cio), a produção de corpos lúteos, pelos dois ovários, ficou próxima em todas as fêmeas e as diferenças entre os lotes de inseminação não foram significativas ($p = 0,971$).

Com relação a proporção embriões/corpos lúteos, as diferenças entre os tratamentos não foram significativas ($p = 0,150$), com exceção aos resultados entre o lote controle (0/0) e o lote 100/100 (50,7% vs 63,3%; $p < 0,05$). Aparentemente a adição do

IAA, somente a 30 °C, durante o processo de congelação, ofereceu melhores condições ao desenvolvimento embrionário. Verificou-se também que entre os diferentes lotes, a taxa de mortalidade embrionária mais elevada, foi encontrada dentro do tratamento controle (BTS, lote 0/0) (Tabela 21).

Tabela 21: Efeito da adição do IAA ao diluente BTS, sobre a proporção do número de embriões/corpos lúteos (CL) de marrãs inseminadas com o sêmen congelado.

Lotes	Diluente	Total de CL	Total de embriões	Nº médio CL/fêmea	Média embriões/fêmea	Embriões/CL (%)
1	0/0	191	96	14,6±3,3 ^a	7,4±3,5 ^a	50,7
2	0/100	141	84	15,7±1,7 ^a	9,3±2,7 ^b	59,2
3	100/0	208	131	16,8±3,5 ^a	10,1±2,8 ^b	60,1
4	100/100	243	150	14,3±2,9 ^a	8,8±3,6 ^{ab}	62,3

Obs.: a diferença entre lotes é expressa por letras sobscritas diferentes (p<0,05).

05. Peso e comprimento dos embriões

Com relação ao comprimento do embrião, as medidas foram tomadas com fita métrica da cabeça até a base da cauda. Para essas características, os resultados não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os tratamentos (p>0,05). Os diferentes diluentes testados nesse trabalho não apresentaram nenhum efeito sobre o desenvolvimento precoce dos embriões (Tabela 22).

Tabela 22: Influência do diluente BTS ou BTS + IAA, sobre o peso e comprimento dos embriões aos 35 dias de gestação.

Lotes	1	2	3	4
	0/0	0/100	100/0	100/100
Peso (g)	2,7±0,7	2,8±0,7	2,5±0,6	2,8±0,9
Comprimento (cm)	3,1±0,4	2,9±0,3	2,9±0,3	3,1±0,4

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

IV. 1. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CONGELADO: ESTUDO *IN VITRO*

01. Discussão

O fato de que o sêmen congelado do varrão possa guardar seu poder fecundante e manter um nível de prolificidade ideal, é um problema ainda não resolvido até esse momento. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de um diluente capaz de guardar um bom nível de motilidade do espermatozoide após a descongelação. Por conte

desses problemas, a inseminação artificial suína com sêmen congelado não é utilizada rotineiramente em nenhum país até o presente momento (XIM e JIAN, 1991). Realmente, os resultados de fertilidade e de prolificidade obtidos, são ainda bem inferiores aos níveis obtidos com o uso do sêmen refrigerado (JOHNSON, 1980; JOHNSON et al., 1981; HAMMITT e MARTIN, 1989; XIN e JIAN, 1991; WABERSKI et al., 1994).

Aparentemente, o momento de adição do IAA à concentração de 10ng/mL, tanto na primeira etapa (30 °C), quanto na segunda etapa (15 °C), não influenciou significativamente os resultados da mobilidade espermática após 5 minutos de incubação. Entretanto, após 2 horas de incubação a 39 °C, houve uma melhora significativa dos parâmetros estudados após a adição do IAA ao diluente de congelamento a 30 °C. Esse resultado sugere uma interação a mais prolongada possível entre o IAA e a célula espermática antes da congelação do sêmen, é necessária.

A adição do IAA ao diluente BTS proporcionou boas perspectivas para sua utilização na congelação do sêmen do varrão, uma vez que apresentou uma ação estimulante sobre o vigor espermático e a motilidade espermática, particularmente quando usado na concentração de 100ng/mL. Esse efeito foi significativo nos dois tempos de incubação do sêmen e igualmente quando foi adicionado somente no diluente de descongelamento (0/100). Apesar desses resultados, foi observada uma queda considerável da porcentagem de espermatozoides móveis após a descongelamento, inclusive apresentando as vezes valores inferiores aos encontrados por outros autores (PURSEL e JOHNSON, 1975; JOHNSON et al., 1982; BWANGA et al., 1992). Esses valores inferiores podem ter sido em decorrência, provavelmente, das variações individuais encontradas entre varrões. A dose de 100ng/mL permitiu uma redução significativa da queda do vigor e da motilidade espermática durante o teste de termorresistência, entre 5 minutos e 2 horas de incubação do sêmen, em relação ao tratamento controle.

Pode ser encontrado com frequência na literatura, em particular nos trabalhos de Watson (1981) e Watson e Plummer (1985), que certos varrões apresentam espermatozoides particularmente sensíveis ao resfriamento rápido. Essa característica se traduz por uma perda de vitalidade por essas células. Pursel et al. (1972a, 1972b) e Pursel e Park (1985), demonstraram que os espermatozoides podem adquirir resistência ao frio sob certas condições. A principal condição é uma pausa mínima de 2 horas antes da queda progressiva da temperatura abaixo dos 15 °C. Tamuli e Watson (1994) mostraram igualmente que os espermatozoides do varrão aumentam a sua resistência ao frio após terem sido mantidos algumas horas à temperatura ambiente (20 °C) antes de serem submetidos ao processo de congelamento. No presente trabalho, o abaixamento da temperatura de 30 °C até 15 °C, foi progressivo e com uma duração de 4 horas.

Devido ao fato de que volumes menores de sêmen apresentam uma velocidade de congelamento/descongelamento mais rápida, o que favorece uma melhor motilidade espermática à descongelamento (MOURA ANDRADE et al., 1989), nesse trabalho o sêmen foi congelado na forma de pastilhas de 0,1mL.

Com relação aos resultados de morfologia espermática, a adição do IAA à temperatura de 30 °C e também na descongelamento, parece necessária para se manter uma melhor taxa de células vivas e intactas. A porcentagem mais elevada de espermatozoides vivos com acrossoma intacto foi sempre obtida com a utilização de meios contendo o

IAA. As diferenças foram significativas entre o tratamento controle sem o IAA (0/0) e o tratamento utilizando 100ng/mL antes da congelação e após a descongelação. Por outro lado, uma característica comum a todos os tratamentos utilizados nesse trabalho, foi a queda da porcentagem de células com acrossoma normal, encontradas após a descongelação. Essa queda também foi observada por Johnson et al. (1982) e Tamuli e Watson (1994), entendida como consequência de um choque térmico, independentemente do tempo de incubação utilizado.

A análise da integridade espermática e comumente utilizada como um indicador da qualidade de fecundação com a utilização de um sêmen congelado. Entretanto, essa relação entre a porcentagem de espermatozoides com acrossoma normal e os resultados de fertilidade é discutível (LARSSON, 1985). Os resultados desse trabalho, em relação às análises *in vitro*, mostraram que com a utilização do IAA pode se obter uma porcentagem mais importante de células vivas com acrossoma intacto. Obonyo et al. (1992), encontraram uma forte correlação entre a fertilidade e a qualidade do sêmen filtrado em lã de vidro, que parece reter as células que possuem o acrossoma danificado ou com membrada partida. Pode-se então esperar a obtenção de melhores resultados de fertilidade com a utilização do IAA, adicionado ao diluente de sêmen, baseado nas observações de Obonyo et al. (1992), que afirmaram ter encontrado as melhores correlações entre a morfologia, motilidade espermática e resultados de fertilidade com a utilização do sêmen após a descongelação.

Larsson e Einarsson (1976a) mostraram que entre os testes utilizados para se verificar o efeito do processo de congelação sobre os espermatozoides, o teste de termorresistência e a medida da concentração extra-celular da aspartato aminotransferase, foram os melhores indicadores da fertilidade de um sêmen, mesmo na ausência de informações à respeito da sua relação com a fertilidade individual dos varrões. A principal finalidade para se testar um sêmen *in vitro*, é de se poder determinar sua qualidade e de poder correlacioná-la com os resultados de fertilidade. O teste de termorresistência é um bom indicador de fertilidade, entretanto, ele deve ser completado com a consideração dos resultados das análises morfológicas, uma vez que a sobrevivência espermática após a descongelação dentro do útero da porca é curta (LARSSON e EINARSSON, 1976a). Isso permite indicar que numerosos espermatozoides, apesar de apresentarem uma boa motilidade, podem ter um acrossoma danificado. Saacke e White (1972) observaram que após a descongelação e incubação a 37 °C, os resultados de fertilidade se encontravam mais ligados à presença de um acrossoma íntegro (65%) do que à motilidade espermática, no sêmen do touro. Por outro lado, eles entenderam que a consideração por um todo dessas características, pode permitir um controle da qualidade do sêmen mais preciso e confiável.

As opiniões com relação as análises *in vitro* de um sêmen e a correlação com a fertilidade são ainda muito divergentes. Devido a isso, é entendido que uma avaliação mais global do ejaculado é necessária e que deve ser levado em consideração, para a correlação com a fertilidade do sêmen, as seguintes características: vigor espermático, motilidade espermática, morfologia espermática após a descongelação; volume do sêmen congelado, concentração da dose inseminante, momento da inseminação, quantidade de

inseminações feitas por fêmea inseminada e congelabilidade do sêmen de um determinado macho doador.

02. Conclusões

⇒ O IAA apresentou uma ação estimulante sobre o vigor e motilidade espermática após congelação/descongelação do espermatozoide, que se traduziu pela manutenção de valores mais elevados destes parâmetros, após incubação do sêmen.

⇒ A melhoria dos resultados da morfologia espermática, obtidos *in vitro*, permitem a espera de taxas de fertilidade mais elevadas com a utilização do sêmen assim tratado, considerando que a inseminação seja feita antes da ovulação.

⇒ Para que os efeitos sobre a morfologia espermática sejam ainda mais evidentes, é necessário a adição do IAA em dois momentos diferentes: antes do processo de abaixamento da temperatura a 30 °C e imediatamente após a descongelação. Talvez seja interessante aumentar a duração do tempo de equilíbrio.

IV. 2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM MARRÃS APÓS CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SOB CONGELAÇÃO

01. Discussão

Na inseminação artificial, com o sêmen congelado, obter resultados de fertilidade e de prolificidade equivalentes aos do sêmen refrigerado, é ainda um desafio para os pesquisadores no domínio da reprodução suína. Sua utilização é limitada no mundo inteiro devido fraca eficácia: taxa de recuperação de espermatozoides e taxa de sucesso nos resultados. Assim sendo, o desenvolvimento de um diluente ou de uma técnica que favoreça os resultados de fertilidade é necessário visando uma maior utilização rotineira do sêmen congelado do varrão.

A adição do composto ativo (IAA) melhora de forma significativa a prolificidade de marrãs inseminadas. Entretanto, as diferentes taxas de fertilidade, entre tratamentos, não foram significativas. O resultado de 63% de marrãs cheias aos 30 dias de gestação foi ainda fraco em relação aos resultados de inseminação artificial com sêmen refrigerado ou àqueles obtidos após a monta natural. Sabendo-se que a célula espermática suína é sensível ao processo de diluição, bem como à composição do diluente utilizado (LARSSON, 1978) e que o número de inseminações no presente estudo foi pequeno (27 inseminações por tratamento), espera-se ainda poder melhorar os resultados de fertilidade com a adição do IAA dentro do meio de congelação/descongelação do sêmen do varrão. Isso poderá ser alcançado através de um estudo mais aprofundado a respeito do modo de ação do IAA, bem como, por futuros experimentos em maiores efetivos de animais.

Numerosos autores desenvolveram diferentes métodos de congelação do sêmen suíno (POLGE et al., 1970; CRABO e EINARSSON, 1971; PURSEL e JOHNSON, 1971a; WESTENDORF et al., 1975; LARSSON e EINARSSON, 1976b; PAQUIGNON e COUROT, 1976). Por outro lado, os protocolos desenvolvidos para a manipulação do sêmen apresentam ainda numerosos defeitos incluindo uma mais fraca

capacidade de sobrevivência dos espermatozoides. Na realidade, esses protocolos induzem a formação de alterações estruturais e funcionais dos espermatozoides, levando à uma redução das taxas de fertilidade. A capacidade de utilização de sistemas *in vitro* para acessar ao *status* funcional dos espermatozoides antes e após a criopreservação é ainda limitado (RODRIGUEZ-MARTINEZ e ERIKSON, 1994).

Utilizando-se diferentes técnicas e diluentes variados, vários pesquisadores observaram taxas de fertilidade inferiores (PAQUIGNON e COUROT, 1976; PAQUIGNON et al., 1976 e 1977; KUO e CHIANG, 1991), equivalentes (PAQUIGNON e du MESNIL du BUISSON, 1973; HAMMITT e MARTIN, 1989; BWANGA et al., 1992) ou superiores (WEITZE et al., 1989) às obtidas por esse trabalho.

Com relação aos resultados de prolificidade, dentro de todos os tratamentos nos quais o IAA foi utilizado nesse trabalho, os resultados foram significativamente melhores do que os obtidos no tratamento controle (0/0). Essa diferença se traduziu por um aumento que chegou a 2,5 embriões por fêmea. Aparentemente o IAA tem uma ação favorável sobre o desenvolvimento embrionário, que merecem estudos mais aprofundados dos seus possíveis mecanismos de ação.

Rodriguez-Martinez e Erikson (1994) mostraram que a fraca viabilidade do sêmen suíno congelado parece ser devido à sua considerável sensibilidade ao choque térmico, levando ao aparecimento de danos à membrana plasmática, à modificações ao nível do equilíbrio iônico e à alterações da sua cromatina. Todos esses eventos podem explicar por que a fecundação e sobrevivência embrionária encontradas são ainda mais fracas que as obtidas com o sêmen refrigerado.

Dentro da técnica de criação em bandas, o momento da inseminação é baseado em cima dos sinais de cio da porca em relação ao momento da ovulação na fêmea. Durante vários anos, foi considerado que a ovulação acontece entre 40 e 42 horas após o início do estro (SOEDE et al., 1995a). No presente trabalho, foi demonstrado que mais da metade das ovulações se encontraram entre 50 e 64 horas. Vários trabalhos mostraram uma influência evidente do intervalo entre inseminação e o momento da ovulação sobre os resultados de fertilidade da porca (WABERSKI et al., 1994). Essa influência foi confirmada nesse trabalho pelos melhores resultados de fertilidade quando o sêmen foi colocado na fêmea em um momento preciso que precedia ligeiramente a ovulação.

Outras características devem ser igualmente levadas em consideração como o retorno ao cio após a desmama e sua duração (BRÜSSOW et al., 1990; WEITZE et al., 1993 e 1994; WABERSKI et al., 1994; SOEDE et al., 1995a e 1995b). Esses fatores são muito importantes e devem ser também levados em conta, nos programas de inseminação artificial, em particular com a utilização do sêmen congelado.

O melhor intervalo entre a inseminação e ovulação está ligado à duração da vida de um número suficiente de espermatozoides férteis, à sua velocidade de transporte, à sua capacitação e à viabilidade do ovócito. O tempo ideal para praticar a inseminação é então limitado (SOEDE et al., 1995b).

Apesar de uma boa sincronização do início do cio entre 35 e 79 horas (90,1%), uma grande variação foi reparada com relação ao início das ovulações situadas entre 20 e 64 horas (91,4%), determinado pelo aumento das concentrações de progesterona sanguínea em relação ao início do estro. Esses resultados são semelhantes aos encontrados

por Martinat-Botté et al. (1995). De fato, esses autores mostraram que um progestágeno utilizado para a sincronização do cio (Régumate) não permitiu uma redução da variabilidade do período de ovulação.

Os resultados do estudo da duração o estro e do momento da ovulação em relação ao momento da inseminação feito em diferentes tratamentos, estão de acordo com os resultados encontrados na literatura (WABERSKI et al., 1994; WEITZE et al., 1994; SOEDE et al., 1995b). Da mesma forma que esses autores anteriormente citados, foi encontrado no presente trabalho, que quando o sêmen é colocado na fêmea após a ovulação, os resultados de fertilidade foram inferiores, daí a importância de se referir ao momento das ovulações.

O momento da inseminação em relação à ovulação é muito importante com relação a ação do composto testado que teve um efeito muito favorável quando a inseminação foi feita antes da ovulação. Além disso o efeito favorável do IAA foi observado nos tratamentos onde sua adição ao diluente BTS foi feita ao menos durante o processo de congelamento. Esses resultados sugerem que o tempo de contato entre o IAA e a célula espermática deve ser suficientemente longo, ou intervir antes das fases de resfriamento.

02. Conclusões

⇒ O conjunto dos resultados mostrou que a adição do IAA ao diluente de congelamento pode melhorar os parâmetros de fertilidade do sêmen congelado. Esses resultados são encorajantes, mas ainda insuficientes, eles devem ser confirmados sobre um efetivo mais importante de fêmeas inseminadas.

⇒ É necessária uma melhora para se aumentar a porcentagem de porcas paridas, uma vez que os números desse trabalho ainda são inferiores aos obtidos com o uso do sêmen refrigerado. Com essa finalidade, novas técnicas e diluentes capazes de manter uma maior porcentagem de espermatozoides viáveis e capazes de fecundar deve ser desenvolvida.

⇒ O estudo e compreensão do momento da inseminação em relação ao momento de ovulação da fêmea suína, sugere que a duração da viabilidade dos ovócitos é relativamente curta, porque mesmo se as inseminações são colocadas logo após a ovulação (≤ 12 horas) as taxas de fertilidade são mais fracas.

REFERÊNCIAS

- BRÜSSOW, K.P.; RATKY, W.; BECKER, F. Determination of the duration of ovulation in gilts by means of laparoscopy. **Reproduction in Domestic Animals**, v.25, p.184-190, 1990.
- BRUTGANS, Y.P. The role of boar semen plasma in fertilisation. **Referativny Zhurnal**, p.83-88, 1982.

- BWANGA, C.O.; MWANZA, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Post-thaw motility, acrosome morphology and fertility of deep-frozen semen packaged in plastic PVC-bags**. In: XII Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, The Hague, p.420-422, 1992.
- CRABO, B.G.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen spermatozoa. **Acta Veterinária Scandinavia**, v.12, p.125-127, 1971.
- EINARSSON, S.; SOOSALU, O.; SWENSSON, S. On the fertility and survival of deep frozen boar spermatozoa thawed in skim milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.13, p.446-118, 1972.
- HAMMITT, D.G.; MARTIN, A. Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. **Theriogenology**, v.32, p.359-368, 1989.
- JOHNSON, L.A. **Artificial insemination of swine: fertility with frozen semen**. In: VI International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, p.37, 1980. (abstract)
- JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; WILLEMS, C.M.T.; SYBERMA, W. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertility capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. **Journal of Animal Science**, v.52, p.1130-1136, 1981.
- JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; ARTS, J.A.M. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. II. Fertility capacity of fresh and frozen spermatozoa in gilts at a fixed time or according to walsmete readings. **Journal of Animal Science**, v.54, p.126-131, 1982.
- KUO, Y.H.; CHIANG, J.C. The fertility of frozen boar semen prepared in macrotubes. **Reproduction in Domestic Animals**, suppl. 1, p.353-357, 1991.
- LARSSON, K. Fertility of deep frozen boar spermatozoa at various intervals between insemination and induced ovulation. Influence of boars and thawing diluents. **Acta Veterinária Scandinavia**, v.17, p. 63-73, 1976.
- LARSSON, K. Deep-frozen of boar semen. **Cryobiology**, v.15, p.352-354, 1978.
- LARSSON, K. **Boar sperm viability after freezing and thawing**. In: JOHNSON, L.A.; LARSSON, K. eds., Frozen Boar Semen, Uppsala, p.177-178, 1985.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. **Acta Veterinária Scandinavia**, v.17, p.74-82, 1976a.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen spermatozoa. Influence of thawing diluents and of boars. **Acta Veterinária Scandinavia**, v.17, p.43-62, 1976a.
- MARTINAT-BOTTÉ, F.; RICHARD, D.; MAUREL, M.C.; PLAT, M.; DESPRÉS, P.; LOCATELLI, A.; GODET, G.; LANDREVIE, J.; BUSSIÈRE, J.; RENAUD, G.; TERQUI, M. Relations entre les taux plasmatiques de LH, de progestérone d'ultrasons et le moment d'ovulation chez la cochette. **Journées de Recherche Porcine en France**, v.27, p.57-62, 1995.

MOURA ANDRADE, J.C.; WEITZE, K.F.; PENA-ALFARO, C.E.; RATH, D. **Influência do método de envasamento/congelamento do sêmen de suíno sobre o número de espermatozoides acessórios e taxa de fertilização.** In: IV Congresso Veterinário de Especialistas em Suínos, Itapema, p.97-99, 1989.

NAGASE, H.; NIWA, T. **Deep freezing bull semen in concentrated pelle form. I. Factors affecting survival of spermatozoa.** In: V International Congress in Animal Reproduction, Trento III, p.410-415, 1964.

OBONYO, M.; LOSETH, K.J.; CRABO, B.G. **Relation between the fertility of frozen boar semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/sephadex filters.** In: XII Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, The Hague, p.505-507, 1992.

PAQUIGNON, M.; COUROT, M. **Survie des spermatozoïdes de verrat après décongélation. Effet durythme de collecte, de la concentration et du taux de glycérol.** **Annales de Biologie Animal, Biochimie and Biophysique**, v.15, p.517-523, 1975.

PAQUIGNON, M.; COUROT, M. **Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa.** In: VIII International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Cracow, p.1014-1044, 1976.

PAQUIGNON, M.; du MESNIL du BUISSON, F. **Fertilité et prolificité de truies inséminées avc du sperme congele. Comparaison de deux diluers. Résultats préliminaire.** **Journées de Recherche Porcine em France**, v.5, p.356-357, 1973.

PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COURROT, M.; du MESNIL du BOUISSON, F. **Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude *in vitro*.** **Journées de Recherche Porcine em France**, v.6, p.71-76, 1974.

PAQUIGNON, M.; DELAHAYE, C.; BUSSIÈRE, J.; COURROT, M. **Fertilité et prolificité de truies inséminées avec du sperme congele: effet du moment de l'insémination.** **Journées de Recherche Porcine em France**, v.8, p.181-184, 1976.

PAQUIGNON, M.; DACHEUX, J.L.; COURROT, M. **Effe du diferentes solutions de décongélation sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat.** **Journées de Recherche Porcine em France**, v.9, p.15-18, 1977.

POLGE, C. **Artificial insemination in pigs.** **Veterinary Record**, v.68, p.62-67, 1956.

POLGE, C.; SALAMON, S.; WILMUT, I. **Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination.** **Veterinary Record**, v.87, p.424-428, 1970.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. **Fertility with frozen boar spermatozoa.** **Journal of Animal Science**, v.33, p.365, 1971a. (abstract)

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. **Fertility capacity of frozen boar spermatozoa.** **Journal of Animal Science**, v.33, p.1162, 1971b. (abstract)

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

- PURSEL, V.G.; PARK, C.S. **Deep-freezing of boar semen**, Eds L.A. JOHNSON, L.A.; LARSSON, K., Uppsala, Swed, University of Agricultural Science, p.147, 1985.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold Shock. **Journal of Animal Science**, v.34, p.278-283, 1972a.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on cold Shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.35, p.580-584, 1972b.
- RICHTER, L.; LIEDICKE, A. **Method of deep freezing boar semen**. In: VII International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Munich, II, p.1617-1621, 1972.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ERIKSON, B. Physiology and preservation of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.29, p.376-378, 1994.
- ROHLOFF, D. Tiefgefrierung von Ebersperma in Pelletform bei -196 °C. **Zuchthygiene**, v.2, p.75-77, 1967.
- ROY, A. Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg-yolk medium. **Veterinary Record**, v.67, p.330-331, 1955.
- SAACKE, R.G.; WHITE, J.M. **Semen quality tests and their relationship to fertility**. In: Technical Conference of Artificial Insemination and Reproduction, Columbia, p.22-27, 1972.
- SAUMANDE, J.; TAMBOURA, D.; CHUPIN, D. Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and of embryos collected. **Theriogenology**, v.23, p.719-731, 1985.
- SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; KEMP, B. **Oestrus (standing response for boar and man) and ovulation in sows**. In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, 293-294, 1995a.
- SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; KEMP, B. **Optimal interval between insemination and ovulation in sows, as judged by fertilization rate and accessory sperm Count of day 5 embryos**. In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, 295-296, 1995b.
- TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. **Veterinary Record**, v.135, p.160-162, 1976.
- WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARS, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, v.42, p.831-840, 1994.
- WATSON, P.F. The effects of cold Shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.T.; CLARKE, A. **Effects of low temperatures on biological membranes**. 1. ed. Academic Press, London, 1981. P.189-218.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. Deep-freezing of boar semen, JOHNSON, L.A. AND LARSSON, K, ed. Upssala, **Swedish University of Agricultural Sciences**, p.113, 1985.

WEITZE, K.F. **Timing of artificial insemination and ovulation in breeding herds I.** In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, 193-199, 1995.

WEITZE, K.J.; RATH, D.; ANDRADE MOURA, J.C. **Influence of seminal plasma constituents on sperm transport after insemination of deep frozen boar spermatozoa.** In: X International Congress of Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, p.314, 1988a.

WEITZE, K.J.; RATH, D.; PENA ALFARO, C.E.; ANDRADE MOURA, J.C.; SCHEID, I. **Influence of diferent sperm number and seminal plasma in the insemination upon number of accessory spermatozoa in pig embryos.** In: X International Congress of Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, p.313, 1988b.

WEITZE, K.J.; RATH, D.; ANDRADE MOURA, J.C. Sperm transport and fertilisation in artificial insemination with frozen boar semen. **Zuchthygiene**, v.24, p.223-228, 1989.

WEITZE, K.J.; SCHWARZ, M.; ANDRADE MOURA, J.C.; WABERSKI, D. **The significance of the interval between insemination and ovulation after artificial insemination with frozen semen in gilts.** In: IV International Congress of Pig Reproduction, Columbia, p.105, 1993.

WEITZE, K.F.; WAGNER-RIETSCHER, D.; KRIETER, J. The onset of heat weaning, heat duration and ovulation as a major factors in artificial insemination timing in sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.29, p.433-443, 1994.

WEITZE, K.F.; WABERSKI, D.; WAGNER-RIETSCHER, D.; RICHETER, L.; KRIETER, J. **The onseT and duration of oestrus and the time of ovulation in primiparus sows major factors in artificial insemination timing in sows.** In: III Conference International of Boar Semen Preservation, Mariense, v.31, p.301, 1995. (abstract)

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Deep-freezing of boar semen: laboratory findings and insemination results with the Hülsenberger Oailleten technique. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.82, p.361-267, 1975.

XIN, X.D.; JIAN, W.S. The freezing technique for boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, supl. 1, p.385-388, 1991.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desse trabalho permitiram de serem formuladas as seguintes conclusões:

- ➡ A adição do IAA ao diluente BTS permitiu de prolongar, de dois a três dias, o tempo de conservação do sêmen sem aumentar o número de espermatozoides por dose. Realmente, até o presente momento nenhum diluente permitiu a ultrapassagem da barreira de três dias de conservação sem perda do poder de fecundação do espermatozoide.
- ➡ A utilização desse composto adicionado ao meio de conservação trouxe melhorias significativas sobre os resultados de morfologia espermática, tanto no sêmen refrigerado quanto no congelado. Estudos complementares são, no entanto, necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos da ação do IAA ao nível de diferentes estruturas da célula espermática (membranas celulares, acrossoma, peça intermediária, flagelo e núcleo).
- ➡ Devido ao armazenamento mais prolongado, as doses de sêmen refrigerado podem ser expedidas e alcançar os criadores mais distantes dos centros de produção espermática. Da mesma forma, torna-se possível de organizar coletas de sêmen de maneira que o sêmen de todos os reprodutores esteja permanentemente disponível em doses de sêmen refrigerado.
- ➡ Novas possibilidades de aplicação dessa tecnologia estão sendo abertas para o sêmen congelado, uma vez que os resultados de fertilidade e de prolificidade podem ser otimizados sob a reserva da escolha mais precisa do momento de inseminação.
- ➡ A utilização da água de coco ou de seus derivados, como diluente do sêmen do varrão, abre novas possibilidades de pesquisas e aplicações no Brasil onde a matéria prima é abundante e as necessidades de melhorias genéticas suínas são importantes.

PERSPECTIVAS

Os primeiros trabalhos utilizando a água de coco como diluente do sêmen animal foram desenvolvidos por pesquisadores brasileiros na Universidade Estadual do Ceará. Esse diluente foi testado no bode e no varrão, com o sêmen refrigerado e inseminações artificiais feitas logo em seguida a coleta do ejaculado. Apesar de bons resultados obtidos, um problema de estabilidade do meio impedia uma conservação mais prolongada do sêmen. Através de trabalhos de purificação feitos no Instituto Nacional da Pesquisa Agronômica (P.R.M.D.), foi identificado dentro da água de coco o composto ácido 3-indol acético (IAA), um produto estável apresentando ação positiva sobre os espermatozoides. Tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho, através de utilização do IAA sintético, podem ser visualizadas as seguintes perspectivas:

- ➡ Os programas de inseminação artificial suína, rotineiros e em grande escala, poderão ser implantados segundo o esquema experimental desenvolvido nesse trabalho. Isso visualizará particularmente a região nordeste do Brasil onde a inseminação artificial suína é menos utilizada. O desenvolvimento de uma técnica que permita a utilização do sêmen sem perda de sua capacidade fecundante, poderá contribuir à criação de um centro especializado em produção de sêmen suíno.
- ➡ Esse esquema experimental poderá ser aplicado com o sêmen de outras espécies animais nas quais sua manipulação deva ser mais delicada.
- ➡ A comparação do IAA sintético com a água de coco bruta ou com suas frações ativas, deverá ser perseguida com a finalidade de se controlar a estabilidade dos parâmetros do meio de conservação e permitir uma utilização sistemática desse novo diluente. De fato, a utilização da água de coco e/ou de seus derivados, deverá permitir um bom desenvolvimento prático uma vez que a matéria prima é encontrada em abundância na região nordeste do Brasil.
- ➡ Um estudo mais aprofundado das frações ativas do plasma seminal, por diferentes combinações entre elas, deverá trazer informações suplementares quanto a sua ação sobre os espermatozoides.



EDITORA IN VIVO



Instagram



Juntos Somos +