

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALINE VIANA DIAS

**AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E A INFLUÊNCIA DA
AMBIÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO**

FORTALEZA

2013

ALINE VIANA DIAS

AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E A INFLUÊNCIA DA
AMBIÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade carnívoros, onívoros, herbívoros e aves

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toniolli

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecário(a) Responsável – Thelma Marylanda Silva de Melo CRB-3 / 623

D541a

Dias, Aline Viana

Ação de substâncias antioxidantes e a influência da ambiência sobre a qualidade do sêmen suíno/ Aline Viana Dias. — 2013.

CD-ROM.91f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof. Dr. Ricardo Tonioll.

1. Ejaculado do varrão. 2. BTS. 3. Ácido fítico. 4. Bioclimatologia. 5. Fertilidade. I. Título.

CDD: 636.0824

ALINE VIANA DIAS

AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E A INFLUÊNCIA DA
AMBIÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 26/ 06/ 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Tonioli
FAVET / Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Prof^ª. Dra. Maria Gorete Flores Salles
UNILAB
Examinadora

Prof^ª Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

À Deus acima de tudo...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado nos momentos em que mais preciso

À Universidade Estadual do Ceará, pelo conhecimento adquirido neste curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro

Aos meus pais, especialmente minha mãe, que sempre me apoiam em todas as decisões da minha vida

Ao meu noivo, Chagas Júnior, por me aguentar em todos os momentos de estresse que o mestrado me proporcionou

Ao professor Dr. Ricardo Toniolli, pelos ensinamentos, orientação, paciência, e por compartilhar suas experiências conosco

Ao sr. Carlos Braga, por abrir as portas da Granja Regina para realização do meu trabalho. E à Elizete por me auxiliar a coletar os dados necessários ao trabalho

Ao Jocemar pela colaboração de sempre

À Lina Raquel, que me proporcionou momentos divertidos e de muito trabalho, sem ela, acredito que meu estresse seria infinitamente maior

À todos que, de uma forma ou de outra, fizeram meus dias mais divertidos dentro do laboratório, e que quando era preciso alguém me auxiliar, nunca me negaram ajuda. Meu agradecimento em especial ao Thalles, Jonseli, Eduardo, Daianny, Tatyane e Ludymila, Thalys e Iury

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada por tudo!!

RESUMO

Uma adequada alimentação influencia favoravelmente na qualidade da produção espermática de um reprodutor. Além disso, o uso do ácido fólico, que é um potente antioxidante, é capaz de inibir a formação de radicais livres e prolongar a qualidade do sêmen conservado. O presente estudo teve como objetivo testar diluentes alternativos e avaliar os efeitos do ácido fólico no diluente do sêmen sobre a qualidade do ejaculado do varrão. O sêmen de cinco reprodutores foi coletado 1x/semana durante 12 semanas, pela técnica da mão enluvada, sendo os ejaculados analisados em laboratório quanto ao volume, concentração, vigor e percentagem de células móveis no dia da coleta e durante todo o período de conservação (D0 a D4), os espermatozoides foram avaliados quanto a vitalidade, integridade de acrossoma e teste hiposmótico. Inicialmente os ejaculados foram conservados em três diluentes: *Beltville Thawing Solution* (BTS), água de coco em pó (ACP-103®) e leite em pó desnatado (LPD) e submetidos a temperatura de 17 °C. Definido o melhor diluente, adicionou-se três diferentes concentrações de ácido fólico (Sigma P8810) 175, 350 e 525 x10⁶ µM/100 mL. Foram inseminadas 35 fêmeas com o diluente BTS adicionado de ácido fólico (AF) e a avaliação da fertilidade realizou-se através dos resultados de fertilidade e prolificidade. Parâmetros bioclimatológicos e fisiológicos foram analisados de manhã e de tarde 3x/semana durante o ano de 2012 e foram divididos em trimestres: janeiro a março (E1), abril a junho (E2), julho a setembro (E3) e outubro a dezembro (E4); sendo determinadas as temperaturas retal e testicular dos animais. Entre os diluentes testados, o BTS proporcionou uma melhor conservação da motilidade e vigor espermático a partir das primeiras 24hs. O tratamento que continha a maior concentração de ácido fólico (T4) obteve resultado significativamente melhor (p<0,05) na porcentagem de células móveis comparado ao controle. No teste hiposmótico em D0 e D4, o melhor tratamento foi T4 quando comparado ao controle. A taxa de fertilidade das porcas inseminadas com BTS + AF foi de 94,3% contra 85,2% das inseminadas apenas com o BTS. A concentração espermática apresentou maiores valores em E1. Entretanto, o total de células produzidas por ejaculado foi menor no período E3 que nos demais, porém diferente estatisticamente (p<0,05) apenas do período E4. O vigor espermático manteve-se constante durante todo o ano, já a motilidade espermática em E3 foi menor em relação aos demais trimestres. As temperaturas escrotal e retal aumentaram nos meses com maior umidade (E1 e E2). A adição do ácido fólico promoveu efeitos positivos em determinadas análises, porém mais estudos devem ser conduzidos (*in vitro* e *in vivo*) para elucidação dos efeitos do ácido fólico sobre o metabolismo espermático.

Palavras-chave: ejaculado do varrão, BTS, ácido fólico, bioclimatologia, fertilidade.

ABSTRACT

An adequate food supply favorably influences the quality of sperm production of a breeder. Beyond that, the use of phytic acid, which is a potent antioxidant, is capable of inhibiting free radical formation and extend the quality of semen preserved. The present study aimed to test alternative diluents and evaluate the effects of phytic acid in the diluent on the quality of boar ejaculated semen. Semen was collected from five breeding once a week for 12 weeks, using the gloved hand technique, being the ejaculated analyzed in the laboratory for volume, concentration, vigor and percentage of motile cells on the day of collection and throughout the retention period (D0 to D4) through the characteristics vitality, acrosome integrity and hyposmotic test. Initially, the samples were kept in three solvents: Beltsville Thawing Solution (BTS), coconut milk powder (ACP) and skimmed milk powder (SMP) and subjected to a temperature of 17 ° C. Being the best diluent defined, three different concentrations of phytic acid (Sigma P8810) 175, 350 and 525 x106 mL μ M/100 were added. 35 females were inseminated with the extender BTS plus phytic acid (PA) and fertility evaluation was calculated using the results of fertility and prolificacy of inseminations. Bioclimatological and physiological parameters were analyzed in the morning and the afternoon 3 times per week during the year of 2012 and were organized in quarters: from January to March (E1), from April to June (E2), from July to September (E3) and from October to December (E4); being determined testicular and rectal temperatures of the animals. Among the tested diluents, the BTS has provided better preservation of motility and sperm vigor after the first 24 hours. The treatment containing the highest concentration of phytic acid (T4) obtained a significantly better result in the percentage of motile cells compared with the control. In the hyposmotic test of D0 and D4, T4 was the best treatment when compared to control. The fertility rate of sows inseminated with BTS – PA was 94,3%, while sows inseminated only with BTS showed a rate of 85,2. The sperm concentration showed higher values in E1. However, the total number of cells produced per ejaculate during E3 was lower than in the others but only statistically different ($p < 0,05$) from the period E4. The spermatocytic vigor remained constant throughout the year, but sperm motility in E3 decreased compared to the other quarters. The scrotal and rectal temperatures increased in the months with higher humidity (E1 and E2). The addition of phytic acid promoted positive effects in some analyzes, but more studies must be conducted (in vitro and in vivo) to elucidate the effects of phytic acid on sperm metabolism.

Keywords: boar semen, BTS, antioxidants, bioclimatology, fertility.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO IV

- Figura 1** Médias mensais da temperatura ambiente e umidade relativa do ar do galpão de reprodutores suínos, na Universidade Estadual do Ceará, no período de janeiro a dezembro de 2012..... **80**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Vigor espermático do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.....	55
Tabela 2	Total de espermatozoides móveis (%) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.....	56
Tabela 3	Total de espermatozoides vivos (%) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.....	57
Tabela 4	Total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.....	58
Tabela 5	Vigor espermático do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico...	59
Tabela 6	Total de espermatozoides móveis (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico.....	59
Tabela 7	Total de espermatozoides vivos (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico.....	60
Tabela 8	Total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico.....	61

CAPÍTULO III

Tabela 1	Resultados de fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído em BTS e BTS + ácido fítico (525µM / 100mL).....	71
Tabela 2	Fêmeas com diagnóstico positivo de gestação, inseminadas com os diluentes BTS e BTS + AF de acordo com a ordem de parto (%)......	71

Tabela 3	Resultados médios de leitões nascidos vivos (LNV), peso médio do leitão (PM) e da leitegada (PML), em fêmeas suínas adultas inseminadas com sêmen diluído em BTS e BTS+AF (525 μ M / 100mL).....	72
-----------------	--	-----------

CAPÍTULO IV

Tabela 1	Valores médios (\pm DP) do volume, concentração espermática, total de espermatozoides, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre.....	81
Tabela 2	Valores médios (\pm DP) do vigor e motilidade espermática, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre.....	81
Tabela 3	Valores médios (\pm DP) da temperatura ambiente, umidade relativa do ar e ITU, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre.....	82
Tabela 4	Valores fisiológicos médios (\pm DP) da temperatura escrotal e temperatura retal de reprodutores suínos, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre.....	82

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
BTS	<i>Beltsville Thawing Solution</i>
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
FAVET	Faculdade de Veterinária
FC	Frequência Cardíaca
FGMD	Farelo de gérmen de milho desengordurado
FR	Frequência Respiratória
IA	Inseminação Artificial
ITU	Índice de temperatura e umidade
LPD	Leite em pó desnatado
OP	Ordem de parto
TA	Temperatura do Ar
TE	Temperatura Escrotal
TR	Temperatura Retal
TS	Temperatura Superficial da pele
UA	Umidade relativa do ar
UECE	Universidade Estadual do Ceará

SUMÁRIO

01 INTRODUÇÃO	14
02 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 A inseminação artificial na suinocultura.....	16
2.2 Métodos de avaliação do sêmen suíno	17
2.3 Refrigeração do sêmen suíno	18
2.4 Diluentes	19
2.5 Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs)	20
2.6 Antioxidantes	20
2.7 Ácido Fítico.....	21
03 JUSTIFICATIVA	23
04 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	25
05 OBJETIVOS	26
5.1 OBJETIVO GERAL	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
06 CAPÍTULO I - Influência do estresse térmico na qualidade do ejaculado do varrão	27
07 CAPÍTULO II - Uso de diluentes alternativos e diferentes concentrações de ácido fítico adicionado ao sêmen suíno conservado.....	49
08 CAPÍTULO III - Uso do ácido fítico adicionado ao diluente BTS na conservação do sêmen do varrão: avaliação <i>in vivo</i>	64
09 CAPÍTULO IV - Influência da ambiência sobre a qualidade do ejaculado do varrão	74
10. CONCLUSÕES GERAIS	85
11. PERSPECTIVAS.....	86
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

01 INTRODUÇÃO

A utilização extensiva da inseminação artificial (IA) segundo Scheid et al. (1986), baseia-se na técnica da conservação do sêmen resfriado, proporcionando resultados de fertilidade semelhantes aos da monta natural. Esta técnica tem-se mostrado eficiente no tocante a difusão de material genético (BORTOLOZZO et al., 2005).

Diversos diluentes têm sido utilizados para resfriar e armazenar o sêmen suíno. A maioria deles mantêm a motilidade espermática em 70% por no máximo 72 horas na temperatura de 15 a 18°C, o que diminui o rendimento da técnica de IA devido a um menor aproveitamento dos ejaculados (COSTI, 2003). Diante disto, numerosos trabalhos têm sido efetuados com a finalidade de desenvolver um diluente para diferentes machos domésticos, sendo adicionado a estes diluentes diversas substâncias, como antioxidantes (JEONG et al., 2009).

Substâncias com ação antioxidante, têm sido utilizadas no tratamento de problemas de fertilidade, tais como: as vitaminas C e E, a glutatona e a coenzima Q10. Indivíduos alimentados com dietas que apresentem níveis apropriados dessas vitaminas apresentaram nos ejaculados uma diminuição de espermatozoides com danos em suas membranas celulares (EICHER, 1994). Neste contexto, o ácido fítico, presente em muitos cereais e com grande concentração no farelo de gérmen de milho desengordurado, é visto como um potente antioxidante natural, capaz de inibir a formação de radicais livres ao ser veiculado através desses ingredientes nas rações (BOHN et al., 2008). Sua estrutura sugere elevado poder de quelação, com alta afinidade pelos cátions polivalentes como cálcio, ferro, zinco, cobre e manganês (GHIRETTI et al., 1997).

Os danos provocados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) afetam a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (VALENÇA; GUERRA, 2007). O efeito oxidativo ocasionado pela geração de EROs seria diminuído através da presença de substâncias antioxidantes ao plasma seminal ou através de sua adição aos diluentes utilizados na refrigeração e na congelamento do ejaculado.

Porém, alguns trabalhos têm demonstrado resultados contraditórios referentes à esta atuação sobre a preservação da viabilidade da célula espermática no sêmen fresco e congelado, inclusive na espécie humana, em virtude da divergência do tipo e da concentração do

antioxidante utilizado, assim como seu mecanismo de ação específico referente à proteção de célula espermática (DONELLY et al., 1999). Desta forma, a utilização de antioxidantes no meio diluente do sêmen suíno é importante para a proteção da célula espermática contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio.

02 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A inseminação artificial na suinocultura

Foi introduzida a inseminação artificial (IA) na suinocultura na tentativa de reduzir os custos envolvidos na cadeia produtiva, bem como o aumento do padrão genético e da qualidade do produto final (CASTAGNA et al., 2001). Segundo Scheid (1992), a IA em escala comercial no Brasil, começou a ser utilizada somente a partir dos anos setenta, devido a uma forte concentração de criadores com alto nível de tecnificação além de taxas elevadas de produtividade.

A grande difusão da IA na espécie suína, utilizando o sêmen resfriado, deu-se graças ao desenvolvimento de diluentes que permitem a conservação das células espermáticas por prolongados períodos de tempo e com fertilidade adequada (GADEA, 2003).

Um aspecto crucial nos procedimentos de IA é a necessidade do transporte do sêmen do local de coleta e processamento até o local onde as fêmeas estão alojadas. Esse transporte pode levar mais de 24 horas, em se tratando de locais de difícil acesso ou em países de grande extensão territorial, como o Brasil. Dessa forma, o sêmen deve ser coletado, processado, transportado e estocado de maneira a não afetar adversamente o potencial fertilizante dos espermatozoides (ALKMIN et al. 2011).

Os ganhos advindos da melhoria genética com a utilização da IA promove uma série de vantagens quando comparada com a monta natural. Como exemplo desta melhoria, é possível citar o maior rendimento de carne e bonificação da carcaça, melhoria na eficiência alimentar, maior ganho de peso e otimização do uso das instalações (CASTAGNA et al., 2001). No entanto, segundo Candini et al. (2000), algumas limitações devem ser consideradas para a obtenção de índices satisfatórios como a qualificação dos funcionários, o bom manejo reprodutivo e a necessidade de proximidade da central de IA ou sua implantação na granja devido à curta viabilidade do sêmen resfriado.

De acordo com Bortolozzo et al. (2005), a refrigeração do sêmen suíno tem se mostrado uma técnica eficiente para a difusão do material genético através dos programas de inseminação artificial. Quando o sêmen é adequadamente processado, é possível a obtenção de altos resultados de prenhez e de prolificidade, com resultados no mínimo, semelhantes aos obtidos com o uso da monta natural.

2.2 Métodos de avaliação do sêmen suíno

Segundo Cavalcanti (1998), o suíno é o que produz maior volume de sêmen por ejaculado, com valores médios em animais adultos que oscilam entre 150 a 500 mL, podendo esta característica ser influenciada pela idade do animal, estação do ano, intervalo entre coletas, estado nutricional e raça.

O sêmen suíno é constituído por três porções: a primeira é a chamada fase pobre de espermatozoides; a chamada fase intermediária que é a mais rica em células espermáticas e por fim, a última porção que forma o tampão vaginal sendo constituída de material gelatinoso, devendo ser separado do restante da amostra por filtrado com gaze (CAVALCANTI, 1998).

A avaliação do ejaculado é dividida em duas etapas: Macroscópicas (análise de volume, aspecto, cor e odor) e Microscópicas (concentração, vigor, motilidade e morfologia). Também pode ser dividida em exame quantitativo e qualitativo. O exame quantitativo é realizado com o objetivo de determinar o número de doses inseminantes a serem produzidas. Já o segundo exame é realizado com objetivo de predizer a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen ou o potencial reprodutivo de um animal, não informando de maneira definitiva se um determinado macho é fértil ou não (BORTOLOZZO et al., 2005).

A concentração espermática é definida como sendo o número de células espermáticas presentes em um ejaculado, por unidade de volume (mL). Podendo ser determinada de três maneiras: espectrofotômetro, espermiodensímetro e a câmara de Neubauer. O espectrofotômetro é um aparelho que mede a concentração através da densidade óptica, permitindo uma análise prática, rápida e precisa. O espermiodensímetro determina a concentração através da observação do grau de turvação de uma suspensão de espermatozoides. Já a câmara de Neubauer é o método de contagem mais demorado, não sendo indicado para um grande número de ejaculados (CORRÊA et al., 2001).

As análise de vigor e motilidade são subjetivas. O primeiro representa a força do movimento do espermatozoide, podendo ser classificado com uma nota de 0 a 5, onde 0 representa a ausência de movimento progressivo com deslocamento de cauda lateral fraco e inexpressivo, e 5 representa um movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides. Apesar desta análise subjetiva, seguindo-se as características pré-determinadas pela tabela de análise de vigor espermático (TONIOLLI, 1996), os resultados obtidos para esta característica, por pessoas bem treinadas, são bastante homogêneos e precisos. Já a motilidade consiste em estimar o percentual

de células com movimentos em relação ao total de células do campo do microscópio analisado (BORTOLOZZO et al., 2005).

A morfologia da célula espermática permite a avaliação qualitativa para se determinar o percentual de alterações na amostra de sêmen. Um alto percentual de defeitos pode significar alterações durante a espermatogênese e maturação espermática. Com esse exame, é possível descartar reprodutores com ejaculados de baixa qualidade para emprego na IA (RODRIGUEZ-MARTINEZ; ERIKSSON, 2000).

2.3 Refrigeração do sêmen suíno

Segundo Sanchez (2003), os espermatozoides podem ser estocados durante períodos prolongados, porém, é necessário manter a integridade celular, reduzir a atividade metabólica e manter sob controle o desenvolvimento de microrganismos, sendo realizada a diluição em meio adequado além do abaixamento da temperatura.

O sêmen suíno, dentre outras espécies de mamíferos é o mais sensível a flutuações de temperatura (CORRÊA et al., 2001). A temperatura de armazenamento do sêmen suíno, entre 15 e 18 °C, não interrompe totalmente o metabolismo dos espermatozoides, que continuam produzindo metabólitos, os quais se acumulam e interferem na motilidade espermática. Além disso, essa temperatura não impede a multiplicação bacteriana, a qual pode afetar a qualidade do sêmen (WEITZE, 1990).

A redução da temperatura tem sido um método utilizado para prolongar a viabilidade dos espermatozoides conservados, devido a seu efeito de desaceleração dos processos metabólicos celulares (ALMOND et al., 1994). Porém, podem acontecer danos irreversíveis a célula espermática em virtude do choque térmico, levando a uma redução da sua motilidade, inchaço na membrana acrossomal e aumento da permeabilidade da membrana plasmática (FERNANDEZ-SANTOS et al., 2006)

Outros procedimentos básicos como a homogeneização da dose inseminante pelo menos uma vez ao dia, manutenção da higiene do conservador, acompanhamento da temperatura interna do conservador e das caixas de transporte de sêmen através de termômetro de máxima e mínima, controle diário da motilidade na central de inseminação artificial (CIA) e na granja onde o sêmen será utilizado colaboram para que a inseminação seja realizada com uma dose inseminante com condições ótimas de fecundação (BORTOLOZZO; WENTZ, 2000)

2.4 Diluentes

O diluente utilizado na inseminação é uma composição bioquímica para dar equilíbrio fisiológico, bioquímico e biofísico aos espermatozoides e ao ambiente que o rodeia, assim ele é composto por uma ampla variedade de substâncias quimicamente diferentes entre si como glicose, antibiótico, sais, dentre outras, que tem como finalidade aumentar o volume do sêmen, proteger o espermatozoide contra choque térmico, fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático, manter o pH e inibir o crescimento bacteriano, permitindo assim a manutenção da viabilidade dos espermatozoides até o momento de serem introduzidos no trato reprodutivo da fêmea (CORRÊA et al., 2001).

Deve-se considerar a escolha do diluente, as condições específicas em que a inseminação artificial ocorre e o tempo que normalmente decorre entre o processamento das doses e a IA. Ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou longos períodos. O manejo da IA adotado e o custo do diluente também influenciam enormemente na sua escolha (BORTOLOZZO et al., 2005).

No Brasil, são utilizados vários tipos de diluentes comerciais nos processos de conservação do sêmen suíno, como o BTS® e o Merck (REIS, 1997). Porém, tem aumentado o interesse por diluentes alternativos, como a água de coco (ACP) e o leite em pó desnatado (LPD).

Trabalhos realizados por diversos pesquisadores demonstraram a viabilidade da água de coco como diluente alternativo de refrigeração e congelamento do sêmen de diversos mamíferos (BARROS; TONIOLLI, 2011). Resultados positivos levaram o pesquisador José Ferreira Nunes à elaboração de um meio comercial de conservação, padronizado e estabilizado, à base de água de coco em pó (ACP; ACP Biotecnologia, Fortaleza, Brasil).

O leite desnatado é utilizado como diluente de sêmen, sendo de uso prático e efetivo na proteção do espermatozoide durante o período de conservação, inclusive preservando melhor a motilidade espermática do que outros diluentes, tanto na forma líquida, quanto pós-descongelamento (KULAKSIZ et al., 2012). Apesar da capacidade de conservação do sêmen ser similar à de outros diluentes nos primeiros dias de armazenamento, em estudo com sêmen ovino, ele não se mostrou capaz na conservação por um período prolongado, devido ao processo de deterioração (KASIMANICKAM et al., 2011).

2.5 Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs)

O efeito prejudicial das espécies reativas ao oxigênio (EROs) sobre as células espermáticas foi descrito por Halliwell; Gutteridge (1999), ao demonstrarem que a exposição do espermatozoide humano a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade com o aparecimento de anormalidades morfológicas nessas células.

As EROs exercem um papel duplo na fertilidade do macho, pois são fundamentais em processos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Porém, podem causar severos danos ao espermatozoide quando os seus mecanismos de defesa estão limitados. Uma produção controlada de EROs é de vital importância para a sua função normal, enquanto que a superprodução e/ou defesas antioxidantes inadequadas levam a estresse oxidativo, com impacto negativo na fertilidade (AITKEN, 1995).

Estudos realizados por vários pesquisadores indicam que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a EROs que promove os maiores danos *in vitro* aos espermatozoides, possuindo funções deletérias, atuando na diminuição da motilidade espermática (ARMSTRONG, 1999).

Segundo Pereira (1996), as EROs possuem vida-média muito curta devido à maior possibilidade de extrair elétrons de outras moléculas e formar outras substâncias reativas. Estas substâncias são altamente lesivas, promovendo modificações na sequência de bases de DNA, causando apoptose celular, alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica, com consequente prejuízo do transporte intracelular (LEITE; SARNI, 2003).

A maioria dos seres vivos possui um eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas EROs formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. As células então possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Esses sistemas participam no bloqueio da ação dos radicais livres antes que eles causem a lesão ou como reparador da lesão ocorrida (ARAÚJO, 2001).

2.6 Antioxidantes

Define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Para combater o estresse oxidativo e a lipoperoxidação, o espermatozoide conta com um sistema antioxidante constituído da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ácido ascórbico e -tocoferol (Aitken, 1995). Extracelularmente, os espermatozoides são protegidos pelo plasma seminal, que contém vários redutores de EROs (enzimáticos e não enzimáticos), como ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathiona e outros tióis, taurina, hipotaurina e vitamina E (ZINI et al., 2000).

O sêmen com concentrações baixas de antioxidantes está associado à baixa qualidade espermática e alto grau de fragmentação do DNA. Essa associação entre a atividade das enzimas antioxidantes e a função espermática defeituosa está ligada a presença de células germinativas primordiais e citoplasma residual no ejaculado (SHAMSI et al., 2009). Por outro lado, processos de criopreservação podem reduzir os níveis dos antioxidantes presentes tanto na célula quanto no plasma seminal, levando a deterioração da qualidade do sêmen após a criopreservação. (STRADAIOLI et al., 2007).

Porém, a eficácia do antioxidante depende do tipo e da concentração das EROs produzidas (PEÑA et al., 2003). Sendo assim possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas falhe na proteção ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas (HALLIWELL, 1990).

A peroxidação dos lipídios ocorre nas espécies reativas ao oxigênio durante a preservação do sêmen, podendo ser agravada na presença de uma maior proporção de ácidos graxos insaturados e do baixo nível de antioxidante presente no espermatozoide. Assim, a suplementação com vários tipos de antioxidantes tem melhorado a viabilidade e motilidade espermáticas no sêmen diluído ou criopreservado de várias espécies (FUNAHASHI; SANO, 2005).

2.7 Ácido Fítico

O ácido fítico (AF) ou mio-inositol hexafosfato (IP6) está presente em cereais, leguminosas, oleaginosas, pólenes e amêndoas, em concentrações variando de 1 a 5% do seu peso (CHERYAN, 1980). É encontrado principalmente no gérmen do milho (BOHN et al., 2008) e sua estrutura sugere elevado poder de quelação, com alta afinidade pelos cátions polivalentes como cálcio, ferro, zinco, cobre e manganês. É considerado um anti-nutriente, por interferir na biodisponibilidade de minerais para suínos (FIREMAN; FIREMAN; 1998).

Uma das principais propriedades do AF é sua habilidade antioxidante, por meio da ligação e inativação dos íons ferro e sua oxidação (WONG; KITTS, 2001). Esses radicais são moléculas altamente reativas que rapidamente reagem com proteínas, lipídios ou DNA, podendo causar desde injúria até morte celular.

Estudos (MIDORIKAWA et al., 2001; SOMASUNDAR et al., 2005) mostram que o ácido fítico apresenta efeito inibidor contra danos oxidativos causados ao DNA e contra tumores, incluindo os de mama e os de cólon. Além de pesquisas recentes mostrando que o ácido fítico e seus sais apresentam uma ampla gama de aplicações. Em virtude do potencial de aplicação do AF como antioxidante e seus efeitos benéficos à saúde, a sua investigação é de grande relevância, não só na alimentação como na adição do AF em diluentes do sêmen para a proteção das células espermáticas contra danos oxidativos.

03 JUSTIFICATIVA

Na suinocultura, o estro das porcas se agrupa em um período de alguns dias, sendo importante o desenvolvimento de uma tecnologia que permita uma longa conservação do poder fecundante dos espermatozoides. Esta possibilidade permitirá uma utilização mais racional de reprodutores e a obtenção de melhores resultados de fertilidade com o uso da inseminação artificial (PAQUIGNON et al., 1982).

A conservação do sêmen sob a forma líquida a 15 °C é o método mais largamente utilizado, entretanto com um limite de três dias do sêmen conservado em um diluente, para a obtenção de resultados viáveis de fertilidade (PAQUIGNON et al., 1982). Weitze (1995), trabalhou no sentido de poder melhorar a qualidade dos diluentes, a fim de se poder aumentar este tempo de estocagem após colheita do ejaculado. Este período de conservação e utilização de um ejaculado do varrão, limita a aplicação da técnica de inseminação artificial em uma maior escala.

Com relação ao meio de diluição, numerosos trabalhos tem sido efetuados com a finalidade de desenvolver um diluente para diferentes machos domésticos. O uso de substâncias adicionadas ao diluente como o cálcio (ROBERTSON et al., 1988), gema de ovo (PHILLIPS, 1939; SALISBURY et al., 1941; SCOBAY et al., 1995, CHAVES et al., 2001), e antioxidantes (JEONG et al., 2009), bem como, diferentes meios como o leite desnatado (WEMHEUER et al., 1996; TONIOLLI et al., 2001) e a água de coco (RIBEIRO-AZEVEDO et al., 1999; SILVA et al., 2007), foram utilizados na conservação do sêmen de diversas espécies domésticas, inclusive o homem.

Os antioxidantes são inibidores de radicais livres que suprimem a formação de espécies reativas ao oxigênio e/ou suas ações. E sua adição ao diluente tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico dos metabólitos reativos do oxigênio (MAIA, 2006).

O ácido fítico, encontrado principalmente no gérmen do milho (BOHN et al., 2008), tem como sua habilidade principal a ação antioxidante, se ligando e inativando os íons ferro e sua oxidação (WONG; KITTS, 2001). Esses radicais são moléculas altamente reativas que rapidamente reagem com proteínas, lipídios ou DNA, podendo causar desde injúria até morte celular.

Após ingestão, o ácido fítico é desfosforilado a fosfatos de inositol menores e estes podem agir como antioxidantes pela inibição do ferro mediador de reações de oxidação,

aumentando a imunidade pelo aumento da função e da atividade das células Natural Killer, ou por estimular a morte de bactérias por neutrófilos (VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006).

A prática do uso de substâncias antioxidantes adicionadas a diluentes de sêmen, tem sido utilizada em várias espécies de forma a diminuir os efeitos deletérios causados pelos metabólitos reativos do oxigênio às células espermáticas. Apesar disto é de conhecimento que estes radicais livres também podem estar presentes em meios com ausência de células, por isto um maior estudo sobre a minimização dos efeitos tóxicos desses compostos sobre o espermatozoide pode ajudar a formulação de melhores diluentes (MAIA et al., 2007).

04 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

O ácido fítico adicionado ao diluente do sêmen será capaz de manter a qualidade espermática, durante todo o período de conservação, independentemente da época do ano.

05 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novas técnicas que possibilitem a conservação prolongada do sêmen do varrão sob a forma refrigerada.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o diluentes alternativos na conservação do sêmen do varrão;
- Avaliar a ação de antioxidante do ácido fítico sobre a conservação espermática;
- Obter dados climáticos de temperatura ambiente e da umidade relativa do ar para determinar suas variações durante as diferentes épocas do ano;
- Avaliar o conforto térmico ambiental e a influência dos fatores climáticos sobre as atividades fisiológica e reprodutiva de suínos criados em clima tropical;
- Avaliar os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de varrões criados em clima tropical nas diferentes épocas do ano;

06 CAPÍTULO I

Influência do estresse térmico na qualidade do ejaculado do varrão

Influence of heat stress on the quality of the boar ejaculate

Dias, Aline Viana; Guimarães, Daianny Barboza; Araújo, Lina Raquel Santos; Cantanhêde, Ludymila Furtado; Barros, Tatyane Bandeira; Toniolli, Ricardo

Periódico: Ciência Rural

Submetido em: 10/05/2013

Influência do estresse térmico na qualidade do ejaculado do varrão

Influence of heat stress on the quality of the boar ejaculate

Aline Viana Dias¹, Daianny Barboza Guimarães¹, Lina Raquel Santos Araújo², Ludymila

Furtado Cantanhêde¹, Tatyane Bandeira Barros¹, Ricardo Toniolli³

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

RESUMO

Para que haja sucesso na implantação de programas de IA, diferentes aspectos devem ser considerados, tais como, estado nutricional, manejo sanitário e qualidade do sêmen, esse último refletindo ainda na qualidade genética e produtiva do plantel, daí a importância de se avaliar o sêmen utilizado. A associação entre elevadas temperaturas, umidade e radiação solar pode acarretar alterações fisiológicas, hematológicas, hormonais, reprodutivas (quantidade e qualidade espermática) e produtivas. O ambiente do sistema de criação intensivo possui influência direta na condição de conforto e bem-estar animal, promovendo dificuldade na manutenção do balanço térmico no interior das instalações, na qualidade química do ar e na expressão de seus comportamentos naturais, afetando o desempenho produtivo e reprodutivo dos suínos. Portanto, informações que possam esclarecer o impacto do estresse térmico sobre a eficiência desses aspectos em suínos, analisando o ambiente em que estão inseridos, e como se comportam frente às adversidades impostas pelo clima, darão uma grande contribuição para a suinocultura e o fortalecimento de sua cadeia produtiva. Diante disso, a compreensão do impacto do estresse térmico sobre vários aspectos da criação de suínos suscita o desenvolvimento de novos trabalhos que possam aprofundar e quantificar os prejuízos desse evento sobre a qualidade do sêmen suíno.

Palavras-chave: estresse térmico, ejaculado, qualidade do sêmen, suíno

ABSTRACT

To have success in the implementation of AI programs, aspects must be considered, such as nutritional status, sanitary handling and semen quality, even though the latter reflects genetic quality and productive squad, which is important to evaluate the semen used. The association between high temperatures, humidity and solar radiation can cause physiological, hematologic, hormonal, reproductive (sperm quantity and quality) and productive changes. The environment of the intensive farming system has a direct influence on the condition of comfort and animal welfare, promoting difficulty in maintaining thermal balance within the premises, in the chemical quality of the air and in the expression of their natural behaviors, affecting the performance and breeding of swine. Therefore, information that may clarify the impact of heat stress on the efficiency of these aspects in swine, analyzing the environment in which they live, and how they behave in the face of adversities imposed by climate, will represent a great contribution to the swine and will strengthen its productive chain. Thus, understanding the impact of heat stress on various aspects of swine farming leads the development of new work that can deepen and quantify the damage of this event on the quality of boar semen.

Key Words: heat stress, ejaculate, semen quality, swine

INTRODUÇÃO

O processo reprodutivo na espécie suína é de fundamental importância, não só para a perpetuação da espécie, mas principalmente por ser um fator decisivo para um desempenho econômico positivo da atividade suinícola. Atualmente, sabe-se que não bastam apenas bons padrões nutricionais e boas práticas de manejo no plantel como um todo. É necessário também que os índices reprodutivos sejam elevados, o que faz com que uma atenção especial seja dada ao plantel de reprodutores, já que estes estão fortemente ligados à produtividade dessa atividade

econômica. Portanto, para que se obtenha bons índices reprodutivos em uma granja, é de extrema importância o monitoramento de todos os fatores que possam ter influência sobre o desempenho reprodutivo dos animais. Particularmente os de origem ambiental, que atuam sobre a saúde e bem-estar animal, constituem-se complementos essenciais e imprescindíveis para um efetivo aumento de produtividade (ALVARENGA et al., 2011).

Antiga é a preocupação com o conhecimento dos problemas decorrentes do aumento da temperatura testicular e sua influência na produção espermática (GABALDI; WOLF, 2002). Atualmente, sabe-se que muitos são os fatores que podem influenciar a qualidade e quantidade de sêmen produzido pelo cachaço durante sua vida reprodutiva útil, tais como: a idade do macho, a frequência de colheitas, a temperatura ambiental, a nutrição e a raça. Podem ser citados também os fatores estressantes em geral, dentre os quais se destacam aqueles que afetam o estado sanitário dos reprodutores e os iatrogênicos, como os provocados por procedimentos errôneos durante a coleta de sêmen (MARTINEZ; WALLGREN, 2000).

O clima é um dos componentes ambientais que exerce efeito mais pronunciado sobre o bem-estar animal, e por consequência, sobre a produção e produtividade. É considerado, portanto, fator regulador ou mesmo limitador da exploração animal para fins econômicos (PEREIRA, 2005).

Considerando que, normalmente, os habitats não são estáticos, os animais devem adaptar-se a diferentes situações por meio de alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais. Os componentes imprevisíveis à vida, causam um estado de emergência que resulta em mudanças no perfil endócrino e metabólico do organismo, permitindo descrever uma reação estressante em termos fisiológicos (MÖSTL; PALME, 2002).

As consequências da exposição dos testículos a altas temperaturas ambientais são a redução da libido, da qualidade seminal e da fertilidade. Segundo Chemineau et al. (1991) a altas

temperaturas ambiente afetam adversamente a qualidade do sêmen provocando o decréscimo na motilidade espermática e o aumento da porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais.

Esta revisão visa fornecer informações que possam esclarecer o impacto do estresse térmico sobre a qualidade do ejaculado suíno, contribuindo para o fortalecimento da suinocultura.

Características e avaliação do ejaculado suíno

Dentre as diversas espécies domésticas, o suíno é o que produz o maior volume de sêmen por ejaculado, com valores médios em animais adultos que oscilam entre 150 a 500 mL. Esta característica pode ser influenciada pela idade do animal, estação do ano, intervalo entre coletas, estado nutricional e raça (CAVALCANTI, 1998).

Segundo Silveira; Scheid (2003), as características do ejaculado (sêmen *in natura*) constituem o passo inicial no controle de sua qualidade, garantindo um nível mínimo de qualidade espermática que irá definir a adequação do ejaculado visando a produção de doses inseminantes com um sêmen que possa garantir um mínimo de resultados de fertilidade.

O sêmen é constituído basicamente por uma parte gelatinosa pobre em espermatozoides e uma parte líquida rica em células. Sua concentração pode variar de 100.000 a 300.000 espermatozoides por mm³, resultando em 20 a 26 bilhões de espermatozoides por ejaculação (LIMA et al., 1999). As primeiras ejaculações ocorrem ao início da puberdade, entre cinco e seis meses de idade, sendo os machos considerados pós-púberes entre 8 a 12 meses, e como adultos, a partir de um ano de idade (CÓRDOVA-IZQUIERDO et al., 2004).

O número ideal mínimo visando uma boa taxa de fertilização varia de quatro a seis bilhões de espermatozoides. A cópula pode variar de 5 a 25 minutos, cuja ejaculação caracteriza-se por apresentar três frações distintas (GARNER; HAFEZ, 1996):

01. Fração pré-espermática: Formada por secreções oriundas da próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais, com volume entre de 10-15 mL. Ela não contém espermatozoides e normalmente apresenta aparência clara ou transparente;

02. Fração rica em espermatozoides: Com volume variando de 70 a 100 mL e assim, apresentando coloração de aspecto branco-leitoso, uma alta concentração espermática, variando de $0,5$ a 1×10^9 spz/mL e secreções produzidas pela próstata e glândulas vesiculares;

03. Fração pós-espermática: Com volume variando de 150-200 mL e poucos espermatozoides. Apresenta aspecto soroso e concentração menor que 1×10^6 spz/mL. Além disso, uma secreção de consistência gelatinosa oriunda das glândulas bulbouretrais é encontrada nessa fração. Apresenta uma grande quantidade de plasma seminal.

Os varrões utilizados como doadores de sêmen devem cumprir as exigências mínimas de volume (>100 mL), motilidade espermática ($\geq 70\%$), morfologia espermática ($<20\%$ de formas anormais) e número total de espermatozoides do ejaculado superior a 10 bilhões (FERREIRA, 1995).

A avaliação qualitativa do ejaculado é realizada com o objetivo de prever a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen ou o potencial reprodutivo de um animal, não informando de maneira definitiva se um determinado macho é fértil ou não. Também é empregada para a identificação de possíveis causas de infertilidade no rebanho ou para detectar alterações que possam comprometer a capacidade fecundante de uma determinada partida de sêmen, sendo dividida nas etapas macroscópicas (análise de volume, aspecto, cor e odor) e microscópicas (concentração, vigor, motilidade e morfologia) (BORTOLOZZO et al., 2005).

Apesar de não ser possível prever com absoluta exatidão a fertilidade de um ejaculado, os resultados obtidos através dessas análises permitem selecionar um ejaculado quanto a sua provável capacidade fertilizante (CORRÊA et al., 2001).

Mecanismo de termorregulação em suínos

Segundo SOUZA et al. (2010), a elevada temperatura ambiental, a umidade do ar e a radiação solar direta são os principais responsáveis por causarem o desconforto fisiológico que leva os animais a adotarem medidas fisiológicas e comportamentais para manter a homeotermia, e que na maior parte das vezes culminam com a redução no desempenho produtivo.

O estresse térmico é definido como sendo o resultado da inabilidade do animal em dissipar calor suficiente para manter a sua homeotermia (WEST, 1999). Podendo ser definido também como uma reação do organismo a qualquer alteração do ambiente, em uma tentativa de manter a homeostase e, no caso de estresse térmico, realizar a termorregulação (MACHADO FILHO; HÖTZEL, 2000).

Para cada espécie animal existe uma faixa de temperatura de conforto, conhecida como zona termoneutra, que é definida como a faixa de temperatura ambiente efetiva, onde a produtividade animal é ótima, sendo limitada inferiormente pela temperatura crítica inferior, onde o animal necessita aumentar a taxa de produção de calor para manter a homeotermia e superiormente pela temperatura crítica superior, região onde o animal deve perder calor para manter a temperatura corporal constante (SOUZA, 2002).

A temperatura ambiente ideal é de 30 a 32 °C para leitões até duas semanas de vida; de 25 a 28 °C para leitões de três a quatro semanas; e 15 a 18 °C para leitões com mais de quatro semanas de vida (MENDES, 2005). No caso de suínos de 20 a 60 kg, a faixa de temperatura de 15 a 22 °C constitui a zona de termoneutralidade, proporcionando o máximo de desempenho do animal. Até mesmo em faixas maiores de temperaturas, correspondentes às temperaturas críticas inferior e superior, de 10 a 25 °C respectivamente, são aceitáveis em relação ao desempenho do suíno (ASHRAE, 2001).

Os suínos, como animais homeotérmicos, possuem um sistema de controle da homeostase, que é acionado quando o ambiente externo apresenta situações desfavoráveis (FERREIRA, 2000). De acordo com Lee; PhillipS (1948), eles são os mais sensíveis a altas temperaturas dentre os animais domésticos. Isso se deve ao seu metabolismo elevado, à capa de tecido adiposo que possuem, além de seu sistema termo regulatório pouco desenvolvido. Os suínos não transpiram e morrem por hipertermia quando sua temperatura retal atinge 44,4 °C.

A temperatura corporal do recém-nascido cai de 1,7 a 6,7 °C (em média 2,2 °C), logo após o parto. O tempo que o leitão leva para alcançar novamente valores fisiológicos normais de temperatura corporal depende diretamente da temperatura ambiente, de seu peso corporal e do momento em que começa a mamar. (MENDES, 2005). Já para animais adultos segundo Sousa (2004), em geral a temperatura normal média situa-se entre 38,5 e 39 °C, quando medida no reto, apresentando variações dentro das diferentes categorias. Temperatura de conforto é aquela na qual se torna dispensável qualquer atividade metabólica por parte do animal para aquecer ou esfriar o corpo (OLIVEIRA et al., 2003)

Resultados de pesquisas mostram que é alterada a atividade da tireóide quando os animais são expostos a temperaturas acima e abaixo das recomendadas, o ambiente quente diminui o metabolismo e as temperaturas frias aumentam, em várias espécies. Segundo FERREIRA (2000), alguns estudos com monogástricos têm mostrado que a motilidade do trato gastrointestinal é reduzida pelo hipotireoidismo e aumentada pela administração de hormônios da tireóide. Tal fato evidencia que a mudança na atividade da tireóide, por causa da exposição do animal às diferentes temperaturas ambientais, pode estar associada à mudança da motilidade intestinal.

A temperatura retal, a frequência respiratória e o nível de sudorese cumprem um importante papel na termorregulação dos animais (NÓBREGA et al. 2011). O efeito termorregulatório inclui processos de comportamento específico nos animais e processos automáticos como

produção ou perda de calor. No caso dos suínos, são animais que sofrem com o calor, pois, são incapazes de transpirar quando a temperatura ambiente se aproxima da temperatura corporal, pois, sob essas condições o calor só pode ser perdido por evaporação (YOUSEF, 1985). Devido ao fato dos suínos terem glândulas sudoríparas afuncionais, o maior componente para aumentar a perda de calor ainda é aumentando a taxa respiratória visto que os suínos são pouco adaptados a condições quentes (LE DIVIDICH et al., 1998). A manutenção da temperatura corporal mais ou menos constante é permitida pela termorregulação a qual assegura o equilíbrio dinâmico entre o calor produzido pelo organismo e cedido ao meio ambiente (MENDES, 2005).

Quando um animal homeotermo é exposto ao estresse pelo calor, a resposta inicial é a vasodilatação, que aumenta o fluxo sanguíneo na pele e nos membros. A resultante elevação da temperatura na pele e a projeção da temperatura central em direção aos membros aumentam o gradiente térmico entre a pele e o ambiente, resultando em uma maior perda de calor por irradiação e convecção. Se apenas a vasodilatação for insuficiente para manter a temperatura normal, aumenta-se o resfriamento por evaporação, pela sudorese, pelo ofego, ou por ambos. Esse resfriamento evaporativo é o único processo de perda de calor disponível quando a temperatura ambiente excede a temperatura da pele (ROBINSON, 2004).

Os suínos em geral possuem a habilidade de dissipar o calor interno por condução através da pele, permitindo-se alcançar temperaturas destas abaixo da temperatura do corpo. Animais adultos se beneficiam desta via de transferência de calor na presença de resíduos, tipos diferentes de piso ou molhados no entorno de bebedouros, onde há desperdício de água. A transferência de calor por condução é diretamente relacionada com a temperatura da superfície do piso (NÄÄS, 1998).

Meio ambiente e bem estar animal em suínos

O ambiente é caracterizado por um conjunto de fatores climáticos que, atuando simultaneamente, exercem influências sobre os animais, afetando seu desenvolvimento biológico, desempenho produtivo e reprodutivo (CURTIS, 1983). O desempenho animal está condicionado às influências do ambiente, podendo submete-los, em função da espécie, às condições estressantes que, dependendo dos limites de tolerância dos mesmos, podem ocasionar reflexos negativos em seu desempenho (TINÔCO, 1996).

Um ambiente é considerado confortável quando o animal está em equilíbrio térmico com ele mesmo, ou seja, o calor produzido (termogênese) pelo metabolismo animal é perdido (termólise) para o meio ambiente sem prejuízo apreciável ao seu rendimento. Quando este equilíbrio não ocorre, caracteriza-se o estresse por calor e o uso de artifícios (fisiológicos) capazes de manter o equilíbrio térmico entre o animal e o ambiente faz-se necessário (PIRES; CAMPOS, 2003).

Em estudo realizado por Kiefer et al. (2010), suínos em terminação expostos ao ambiente de estresse por calor, permaneciam mais tempo deitados quando comparado aos mantidos sob conforto térmico. O mesmo foi observado em estudo realizado por Kiefer et al. (2009) para suínos em fase de crescimento, em que os animais posição deitado e dormindo quando submetidos ao ambiente com temperatura ambiental elevada.

Um ambiente estressante provoca várias respostas, dependendo da capacidade do animal para adaptar-se. Em determinadas situações ambientais, o animal pode manter todas as suas funções vitais (manutenção, reprodução e produção) e, em outras, estabelece prioridades. É importante mencionar que a função vital prioritária do animal é a manutenção (sobrevivência), mas tanto ela quanto a reprodução e a produção vão sendo suprimidas à medida que o ambiente torna-se mais severo (MULLER, 1989).

O ambiente interno de uma instalação normalmente é resultante das condições locais e externas, das características construtivas e dos materiais da instalação, da espécie, do número de animais, do manejo, das modificações causadas pelos equipamentos do sistema produtivo e pelos que tem como objetivo o acondicionamento ambiental (BAETA; SOUZA, 1997).

Calor e umidade elevada podem resultar em estresse crônico, especialmente se acompanhados por uma ampla flutuação da temperatura, resultando em diminuição na ingestão de alimento e interferência na espermatogênese (KUNAVONGKRIT et al., 2005). Qualquer estímulo ambiental sobre um indivíduo que sobrecarregue os seus sistemas de controle e reduza a sua adaptação ou tenha potencial para isto resulta em estresse (FRASER; BROOM, 1990).

Os parâmetros fisiológicos de temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR), temperatura superficial da pele (TS) e frequência cardíaca (FC) sofrem influência do turno do dia, uma vez que à tarde a temperatura do ar (TA) é geralmente bem mais elevada que durante a manhã, promovendo uma elevação dessas variáveis fisiológicas (SILVA et al., 2010). Segundo Medeiros et al. (2007), nos animais que são normalmente ativos durante o dia, há uma variação da temperatura retal que é mínima pela manhã e máxima no período da tarde. Tal fato faz com que a temperatura do ar à tarde venha a ser a origem da temperatura retal elevada dos animais nos trópicos, principalmente na estação seca. O severo estresse crônico pode resultar em períodos de altas concentrações de cortisol, diminuindo a aptidão individual por causar imunossupressão e atrofia dos tecidos de defesa do organismo. Adicionalmente, o sucesso reprodutivo dos animais diminui, e comportamentos estereotipados desenvolvem-se (MÖSTL; PALME, 2002).

Temperatura e consumo de ração

Em condições de calor os suínos necessitam minimizar a resistência à perda de temperatura, e se for necessário, podem reduzir sua produção de calor, diminuindo o consumo de alimentos o

que não é tecnicamente desejável (CLARK, 1981). Quando os suínos são mantidos em ambientes com temperaturas maiores ou menores que 21 °C, há uma diminuição no ganho de peso, tanto em altas quanto em baixas temperaturas, porém as mais altas são mais prejudiciais. Por outro lado, quando são submetidos a uma temperatura de 43,2 °C todos os suínos perdem peso e poucos são os que sobrevivem (SOUZA, 2002).

Segundo Ferreira (2000), é importante enfatizar que as temperaturas críticas, superior e inferior, são influenciadas por vários fatores, tais como:

- a) Nível de alimentação: quanto maior for o consumo de alimento, menor será a temperatura crítica inferior em função do calor fornecido ao animal pelo alimento, possibilitando-o suportar temperaturas ambientais mais baixas;
- b) Manejo dos animais: O tipo de alojamento, individual ou em grupo, poderá influenciar a dissipação de calor do animal para o ambiente;
- c) Temperatura do alimento: A temperatura da ração e da água consumida pode ter efeito, principalmente quando grande quantidade de água fria é consumida no período de inverno;
- d) Temperatura e tipo de piso: A temperatura e o tipo de cama utilizada poderão influenciar a troca de calor animal-ambiente, modificando conseqüentemente, as temperaturas críticas dos leitões.

O efeito prejudicial da temperatura é mais acentuado em animais maiores, pois existe uma relação direta entre temperatura, consumo de ração e peso vivo. Suínos mais pesados são os mais afetados pela ação de temperaturas altas. Isto ocorre pela maior dificuldade dos animais adultos para perderem calor. Já foi constatado que a redução do consumo de ração se dá pelo menor tempo total usado para ingestão, ou seja, o tempo individual de cada refeição diminui (QUINIOU et al. 2000).

Animais submetidos a ambientes com altas temperaturas ingerem menores quantidades de energia, o que resulta em carcaças com menor teor de gordura. Contudo, estes resultados podem estar relacionados com o efeito da temperatura por si só, pois nessas condições parece haver uma redução na eficiência de utilização da energia ingerida. Da mesma forma, têm-se observado que há uma redistribuição anatômica da gordura depositada pelos suínos quando são submetidos a períodos prolongados de altas temperaturas. Há um maior acúmulo de gordura nos depósitos internos (gordura interna e vísceras) em detrimento a gordura subcutânea (FIALHO et al. 2001).

O estresse térmico e a qualidade espermática

A temperatura é um dos importantes fatores ambientais que interfere na reprodução. Temperaturas corporais elevadas, durante períodos de maior calor ambiente ou pirexia por doenças, podem levar à degeneração testicular e a redução da porcentagem de espermatozoides normais e férteis no ejaculado (JAINUDEEN; HAFEZ, 1995). É o fator de maior importância na espermatogênese de qualquer espécie e, quando muito elevada, é prejudicial tanto às etapas de formação dos espermatozoides como àqueles elementos já formados e em trânsito pelo epidídimo (MIES FILHO, 1975).

Os efeitos do estresse térmico sobre a eficiência reprodutiva de reprodutores suínos decorrem da redução na quantidade e qualidade do sêmen, verificada por ejaculados com menor motilidade, pelo aumento na porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos (LARSSON & EINARSSON, 1984), pelo aumento do número de espermatozoides com gota citoplasmática proximal e pela produção reduzida de espermatozoides (MCNITT et al., 1972), além do menor volume total do ejaculado (KUNAVONGKRIT; PRATEEP, 1995).

Os principais fatores que afetam a morfologia espermática são temperatura e umidade elevadas, ocasionando redução no número de espermatozoides normais e aumento no aparecimento de

gota plasmática proximal e distal no ejaculado. A combinação desses dois fatores é mais deletéria para a função testicular do que cada um agindo em separado (SURIYASOMBOON et al., 2005; 2006). Outro grave efeito negativo da temperatura sobre a qualidade seminal, segundo Nascimento; Santos (2003), é a degeneração testicular. Essa patologia é ocasionada, entre muitos fatores, por qualquer processo que determine a elevação da temperatura dos testículos, como, por exemplo, a dermatite escrotal, o excesso de gordura escrotal, edema, periorquite e elevação da temperatura ambiente com conseqüente estresse térmico.

Rozeboom et al. (2000), observaram diferenças significativas na qualidade do sêmen suíno em relação às estações do ano, verificando que, nas estações quentes, a qualidade do sêmen declinou significativamente. Já Rivera et al. (2005), observou que as mudanças na qualidade do sêmen nas diferentes estações do ano são devido a outros fatores e não ao fotoperíodo. Outro aspecto seria a flutuação de temperatura entre dia e noite que pode ser um fator estressor durante os meses quentes do ano (KUNAVONGKRIT et al., 2005).

Uma das possíveis causas para as alterações seminais observadas é a mudança na atividade da enzima acrosina dos espermatozoides produzidos durante o período de elevadas temperaturas (CIERESZKO et al., 2000). Já segundo Corcuera et al. (2002), ao analisarem doses de sêmen oriundas de machos adultos, entre 2 e 3 anos de idade, alojados em ambientes sem controle de temperatura e doses de sêmen oriundas de machos adultos alojados em ambientes controlados, verificaram que a motilidade e a percentagem de acrossomas normais foram maiores na segunda situação. Essa redução na qualidade dos ejaculados poderia também ser devido ao calor direto sobre o testículo interferindo no seu mecanismo de termorregulação. Outra possível causa relatada seria a menor ingestão de alimentos devido ao estresse calórico sofrido pelos animais (RINALDO et al., 2000) o que interferiria no processo espermatogênico.

Os efeitos negativos das altas temperaturas e umidade sobre a espermatogênese, com aumento do número das anormalidades espermáticas e, possivelmente, conseqüente redução do número

de doses inseminantes por ejaculado, podem causar prejuízos financeiros para a granja, pela necessidade de se aumentar o número de machos para atender a demanda de doses inseminantes. Esses fatos deveriam ser considerados, quando da manipulação de ejaculados destinados à inseminação artificial, nas diferentes épocas do ano, principalmente, em granja com galpão não climatizado. A utilização de ejaculados com altos percentuais de patologia espermática poderia reduzir o número de leitões por nascimento, mesmo em doses heterospérmicas (FRENEAU et al., 2012).

CONCLUSÃO

Com o aumento no grau de confinamento dos suínos, o ambiente foi modificando para completamente artificial podendo ser um potencial problema na criação, acarretando um inadequado desenvolvimento dos animais. O estudo de efeitos do ambiente sobre a qualidade espermática é de grande importância, pode promover a adequação das práticas de manejo em horários do dia e período do ano mais favorável quanto ao clima, considerando além da produtividade, o bem-estar animal. Diante disso, a compreensão do impacto do estresse térmico sobre vários aspectos da criação de suínos suscita o desenvolvimento de novos trabalhos que possam aprofundar e quantificar os prejuízos desse evento sobre a qualidade do sêmen suíno.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSEGURANÇA

Projeto de pesquisa intitulado «Ação de substâncias antioxidantes e influência da bioclimatologia sobre a qualidade de sêmen suíno conservado», segundo processo nº 10724798-4/11, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 20 de maio de 2011, tendo atendido os critérios solicitados pela CEUA-UECE.

REFERÊNCIAS

ASHRAE. Thermal comfort. In: **ASHRAE Fundamentals**. 2001. Cap.8, 29p.

ALVARENGA, A. L. N.; ZANGERONIMO, M. G. OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D. S. **Aspectos reprodutivos e estresse na espécie suína**. Universidade Federal de Lavras: Departamento de Medicina Veterinária, 2011. 40p. (Boletim Técnico, 86)

BAÊTA, F.C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em edificações rurais – conforto animal**. UFV, 1997, 246p.

BORTOLOZZO, F.P. et al. **Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada Suinocultura em Ação**. Porto Alegre, RS: Pallotti, 2005. 185p.

CAVALCANTI, S.S. **Suinocultura Dinâmica**. Minas Gerais: FEP-MVZ, 1998. 494p.

CHEMINEAU, P. et al. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO: Rome, 1991. 222p.

CIERESZKO, A.; OTTOBRE, J.S.; GLOGOWSKI, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.89-96, 2000.

CLARK, J.A. **Environmental aspects of housing for animal production**. London: Butterworths, 1981. 511p.

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

CÓRDOVA-IZQUIERDO, A. et al. Características del semen de verraco y su evaluación práctica. **Porcinocultura**, 2004. Disponível em:

<http://66.147.240.151/~porcicul/articulos/?seccion=ia&tema=iar021> Acesso em: 20 dez. 2012.

CORRÊA M.N. et al. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001. 181p.

CURTIS, S.E. **Environmental management in animal agriculture**. Ames: The Iowa State University Press, 1983. 409p.

FERREIRA, F.M. **Comportamento sexual e características espermáticas em suínos jovens com diferentes desempenhos de crescimento**. 1995. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERREIRA, R.A. Efeitos do clima sobre a nutrição de suínos. In: ENCONTROS TÉCNICOS ABRAVES. 11., 2000, Chapecó. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2000. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2000/1_RonyFerreira.pdf

FIALHO, E.T. et al. Interações ambiente e nutrição – estratégias nutricionais para ambientes quentes e seus efeitos sobre o desempenho e características de carcaça de suínos. In: II CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2001, Concórdia. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_fialho_pt.pdf

FRASER, A. F.; BROOM, D. M. **Farm animal behaviour and welfare**. Wallingford: CAB International, 1990. 448p.

FRENEAU, G.E.; FERREIRA, J.D.J.; SOBESTIANSKY, J. Avaliação das características seminais de varrões mantidos em centrais de inseminação artificial com ambiente climatizado e não climatizado durante 12 meses. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 466-478, 2012. Disponível em:

http://www.researchgate.net/publication/234128972_AVALIAO_DAS_CARACTERISTICAS_SEMINAIS_DE_VARRES_MANTIDOS_EM_CENTRAIS_DE_INSEMINAO_ARTIFIC

IAL_COM_AMBIENTE_CLIMATIZADO_E_NO_CLIMATIZADO_DURANTE_12_MES

ES> Acesso em: 15 mar. 2013. doi: 10.5216/cab.v3i4.18029.

GABALDI, S. H; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias e Saúde**. FEA, v. 2, n. 2, jul-dez, p. 66-70, 2002.

Disponível em:

<http://www.fea.br/Arquivos/Revista%20Cientifica/Volume%2002%20N%C2%BA%2002%202002/artigo%2013%20v%20n2.pdf> Acesso em: 10 ago. 2012.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides y plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Eds). **Reproducción e Inseminación Artificial en Animales**. 6.ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p. 158–179.

KIEFER, C. et al. Resposta de suínos em crescimento mantidos em diferentes temperaturas. **Archivos de Zootecnia**, v.58, n.221, p.55-64, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922009000100006> Acesso em: 10 abr. 2013. doi: 10.4321/S0004-05922009000100006

KIEFER, C. Resposta de suínos em terminação mantidos em diferentes ambientes térmicos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n. 2, p. 496-504 abr/jun, 2010. Disponível em: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1649/985> Acesso em: 05 jan. 2013

KUNAVONGKRIT, A.; PRATEEP, P. Influence of ambient temperature on reproductive efficiency in pigs: boar semen quality. **Pig Journal**, v. 35, p.43-47, 1995.

KUNAVONGKRIT, A. et al. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v. 63, p.657-667, 2005.

LARSSON, K.; EINARSSON, S. Seminal changes in boars after heat stress. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 25, p.57-66, 1984.

LE DIVIDICH, J. et al. Thermoregulation. **Progress in Pig Science**, Nottingham: Nottingham University Press. C 1998, p. 229 – 263.

LEE, D.H.K.; PHILLIS, R.W. Assessment of the adaptability of livestock to climatic stress. **Journal of Animal Science**. v.7, n.4, p.391-425, 1948.

LIMA, J. A. F. **Suinocultura técnica**. Lavras: UFLA/FAEPE. 1999. 203p

MACHADO FILHO, L.C.P.; HÖTZEL, M.J. Bem estar dos suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 5, 2000, São Paulo, SP. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2000. p.70-82.

MARTÍNEZ, H.R.; WALLGREN, M. Factores que influncian la calidad espermática em verracos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL MINITUB – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 3. **Anais...** p. 34-41, 2000.

MCNITT, J.I. et al. Thermoregulation in the scrotal system of the boar. I. Temperature distribution. **Journal of Animal Science**, v.34, p.112-116, 1972. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/34/1/112.full.pdf+html> Acesso em: 20 abr. 2012.

MEDEIROS, L.F.D. et al. Avaliação de parâmetros fisiológicos de caprinos SPRD (sem padrão racial definido) pretos e brancos de diferentes idades, à sombra, no município do Rio de Janeiro. **Boletim da Indústria Animal**, v.64, n.4, p.277-287, 2007.

MENDES, A.S. **Efeito do manejo da ventilação natural no ambiente de salas de maternidade para suínos**.2005, 107f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino: função espermatogênica e função endócrina do testículo. In: Mies Filho, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 3.ed. Porto Alegre: Sulina, 1975, p.99-133.

MÖSTL E, PALMER. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2002.

MULLER, R.P. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. Porto Alegre: Sulina, 1989. 262p.

NÄÄS, I. A. et al. Determining the ideal ventilation system in swine production - A Case Study. In: Proceedings of the 7th International Conference on Computers in Agriculture. 1998. St Joseph, MI. p 923-929.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L., 2003. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. 137p.

NÓBREGA, G. H. et al. A produção animal sob a influência do ambiente nas condições do semiárido nordestino. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Vol. 06, n. 01, p. 67- 73, 2011.

OLIVEIRA, P.A.V. et al. Efeito da temperatura no desempenho zootécnico de suínos em crescimento e terminação nos sistemas de camas sobrepostas e piso concretado. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 10/2003, Concórdia, SC. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2003. p.401.

PEREIRA, C.C.J. **Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005. 195p

PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. Relação dos dados climáticos com desempenho animal. In: RESENDE, H. et al. **Dados climáticos e sua utilização na atividade leiteira**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 103-114

QUINIOU N. et al. Voluntary feed intake and feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. **Livestock Production Science**, v.63.p. 245-253, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00135-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00135-9) doi: [10.1016/S0301-6226\(99\)00135-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00135-9)

RINALDO, D. et al. Adverse effects of tropical climate on voluntary feed intake and performance of growing pigs. **Livestock Production Science** v. 66, p. 223–234, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00181-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00181-0) doi: 10.1016/S0301-6226(00)00181-0

ROBINSON, N.E. Homeostase – Termorregulação. In: Cunningham JG. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.550-560.

ROZEBOOM, K. et al. Coping with seasonal infertility in the herd: part I, 2000. **Swine News**. V. 23, n. 3, abr. 2000.

SILVA, E.M.N. et al. Avaliação da adaptabilidade de caprinos ao semi-árido através de parâmetros fisiológicos e estruturas do tegumento. **Revista Caatinga**, v.23, n.2, p.142-148, 2010.

SILVEIRA PR, SCHEID I. Qualidade de sêmen no processo de Inseminação Artificial. **Suinocultura Industrial**, n.6, p.33-38, 2003.

SOUZA, B. B. et al. Efeito do ambiente sobre as respostas fisiológicas de caprinos saanen e mestiços ½ saanen + ½ boer no semiárido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**. Vol. 06, n. 02, p. 47 - 51, 2010.

SOUZA, P. **Avaliação do índice de conforto térmico para matrizes suínas em gestação segundo as características do ambiente interno.** 2002. 117f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

SOUZA, P. **Conforto térmico e bem estar na suinocultura.** I. ed. Lavras: UFLA, 2004. 69p.

SURIYASOMBOON, A. et al. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in duroc boars under different housing systems in Thailand. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, p.777-785, 2005.

SURIYASOMBOON, A. et al. Effect of temperature and humidity on reproductive performance of crossbred sows in Thailand. **Theriogenology**. v.65, p.606-628, 2006.

TINÔCO, I.F.F. **Efeito de diferentes sistemas de acondicionamento de ambientes e níveis de energia metabolizável na dieta sobre o desempenho de matrizes de frango de corte, em condições de verão e outono.** 1996. 173f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federal De Minas Gerais.

WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.21-35, supplement 2, 1999.

YOUSEF, M. K. **Stress Physiology in Livestock.** Poultry, Boca Raton, v. 3, p. 159, 1985.

07 CAPÍTULO II

**Uso de diluentes alternativos e diferentes concentrações de ácido fítico
adicionado ao sêmen suíno conservado**

*Use of alternative extenders and different concentrations of phytic acid
added to stored boar semen*

Aline Viana Dias, Daianny Barboza Guimarães, Lina Raquel Santos Araújo, Ludymila
Furtado Cantanhêde, Tatyane Bandeira Barros, Ricardo Toniolli

Periódico: Semina: Ciências Agrárias

Submetido em: 05/07/2013

Uso de diluentes alternativos e diferentes concentrações de ácido fítico adicionado ao sêmen suíno conservado

Use of alternative extenders and different concentrations of phytic acid added to stored boar semen

Aline Viana Dias¹, Daianny Barboza Guimarães¹, Lina Raquel Santos Araújo², Ludymila Furtado Cantanhêde¹, Tatyane Bandeira Barros¹, Ricardo Toniolli³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE; ²Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LabSuis)/UECE; ³Orientador, LabSuis – FAVET/UECE, Av. Paranjana, 1700 – Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000, email: toniolli@roadnet.com.br

Projeto de pesquisa segundo processo nº 10724798-4/11, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 20 de maio de 2011, tendo atendido os critérios solicitados pela CEUA-UECE.

RESUMO

Antioxidantes são utilizados na conservação do sêmen de diversas espécies domésticas. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo verificar o melhor diluente para adicionar diferentes concentrações de ácido fítico e verificar os efeitos sobre os espermatozoides suínos conservados. Na etapa I, 60 ejaculados e três diluentes foram utilizados: BTS; LPD e ACP-103[®]. Já na etapa 2, O BTS como melhor diluente da I etapa, foi acrescido de três concentrações de ácido fítico (n= 60): (T1) BTS (controle); BTS+175µM de ácido fítico (T2); BTS+350µM (T3); e BTS+525µM (T4). Foram realizadas análises diárias de vigor e motilidade, e em D0 e D4 foram realizados os testes hiposmótico e de vitalidade e integridade acrossomal. A motilidade espermática no T4 foi superior (p<0,05) em relação ao T1. Em relação ao percentual de espermatozoides vivos, não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos testados, porém, tratando-se da integridade da membrana, o T4 em D0 e D4 obteve significativamente melhor resultado (p<0,05) em relação ao T1. A adição do ácido fítico no BTS promoveu efeitos positivos em determinadas análises, porém mais estudos devem ser conduzidos para elucidação dos efeitos do ácido fítico sobre o metabolismo espermático.

Palavras-chave: ejaculado suíno, BTS, ácido fítico, antioxidantes.

ABSTRACT

Antioxidants are used for the preservation of semen from several domestic species. Thus, the present study aimed to determine the best diluent for adding different concentrations of phytic acid and verify the effects on conserved boar sperm. In the step I, 60 ejaculated and three extenders were used: BTS; LPD and ACP-103[®]. In the step II, the BTS, best diluent of step I, has received three concentrations of phytic acid: (T1) BTS (control); BTS + 175mM of phytic acid (T2); BTS + 350mM (T3) and BTS +

525mM (T4). Daily analyzes of vigor and motility were performed, and in D0 and D4 the following tests were performed: hyposmotic vitality and acrosomal integrity. The sperm motility on T4 was higher ($p<0.05$) when compared to T1. Regarding the percentage of live sperm, no significant difference was found in any of the tested treatments, however, in the case of membrane integrity, T4 in D0 and D4 achieved significantly better results ($p<0.05$) in comparison with T1. The addition of phytic acid in BTS promoted positive effects in some analyzes, but more studies must be conducted to elucidate the effects of phytic acid on sperm metabolism.

Keywords: boar semen, BTS, phytic acid, antioxidants.

INTRODUÇÃO

A grande maioria das inseminações artificiais (IA) realizadas em suínos utiliza sêmen diluído e conservado a temperaturas entre 15 e 18 °C, por um período máximo de 5 dias. Constata-se também que, 85% destas IA são realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte (JOHNSON et al., 2000). Várias formulações de diluentes foram testadas e usadas em sêmen de varrões. Resultados consistentes foram encontrados com o uso do *Beltville Thawing Solution* (BTS), diluente de baixo custo com um número limitado de ingredientes em sua fórmula. Ele é um dos diluentes mais utilizados nos protocolos de IA, apesar de permitir a estocagem do sêmen durante um número limitado de dias (WOELDERS, 1992).

Numerosos trabalhos têm sido efetuados com a finalidade de desenvolver um diluente para o sêmen de diferentes machos domésticos. O uso de várias substâncias adicionadas ao diluente como antioxidantes (JEONG et al., 2009), crioprotetores e aminoácidos (LINDEBERG et al., 1999; FAGUNDES et al., 2010), bem como diferentes meios como o leite desnatado (MEIRELLES et al., 1998; TONIOLLI et al., 2001) e a água de coco (NUNES; SALGUEIRO, 1999; CARDOSO et al., 2002; TONIOLLI et al., 2010), vem sendo utilizados na conservação do sêmen de diversas espécies domésticas.

Segundo Stryer (1996), uma das razões que explicam a diminuição da qualidade do ejaculado de um reprodutor é a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres, ou seja, átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons despareados. Sendo os antioxidantes poderosos inibidores de radicais livres, suprimindo a formação de espécies reativas ao oxigênio e/ou suas ações. A sua adição aos diluentes, tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico destas EROs (MAIA, 2006).

O ácido fítico (AF) presente em grandes concentrações no farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), é visto como um potente antioxidante natural, capaz de inibir a formação de radicais livres ao ser veiculado através desses ingredientes nas rações. (BOHN et

al. 2008). Em estudo realizado por Pacheco et al. (2012), carnes originadas de animais que receberam dietas de rações com FGMD apresentaram menores índices de oxidação, apesar destas rações conterem maior quantidade de óleo de soja, em comparação às dietas sem inclusão do FGMD, fato este que sugere ser eficiente o efeito antioxidante do ácido fítico veiculado pelo mesmo. Diante destes resultados, pode-se sugerir que o ácido fítico, devido a sua capacidade quelante principalmente com minerais, interagiu especificamente com o ferro e inibiu sua capacidade de formar os radicais hidroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica (GRAF; EATON, 1990). Por essa razão, o AF é indicado como um antioxidante ideal para a carne suína, já que esta possui elevado teor de ferro, um mineral catalisador da oxidação em produtos cárneos. Porém, ainda não existem trabalhos com a adição do AF no diluente do sêmen.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diluentes de sêmen alternativos bem como verificar a eficiência do ácido fítico adicionado em diferentes concentrações no diluente do sêmen sobre a qualidade do ejaculado do varrão.

MATERIAL E MÉTODOS

01. Reprodutores e coleta de sêmen

O sêmen de cinco reprodutores foi coletado uma vez por semana, durante 12 semanas ($n = 60$) na etapa I. A coleta foi realizada pela técnica da mão enluvada em recipiente coberto por filtro e protegido por copo térmico. Foi aproveitado o ejaculado após a separação da parte gelatinosa. Foram utilizados animais com idades variáveis entre 12 e 24 meses, provenientes do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen da FAVET/UECE. A qualidade do ejaculado foi avaliada pelas características concentração ($\times 10^6$ spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996) e total células móveis (%). Só foram aproveitados os ejaculados que apresentassem valores de $\geq 3,0$ para o vigor e $\geq 80\%$ de espermatozoides móveis. Na etapa II o sêmen de cinco reprodutores foi coletado uma vez por semana, durante 12 semanas, com $n = 60$ como na etapa I. O local e a avaliação da qualidade do ejaculado foi realizada de acordo com descrito na etapa I.

02. Diluição do sêmen e tratamentos experimentais

Na etapa I foi separado de cada ejaculado um total de $2,1 \times 10^9$ spz, repartido equitativamente entre três tratamentos (35×10^6 spz/mL), com um volume final por tratamento de 12,5 mL (sêmen + diluente), envazados em cinco tubos de ensaio/tratamento (2,5 mL = $87,5 \times 10^6$ spz/tubo). O dia da coleta foi considerado dia zero (D0) e o sêmen foi conservado até quatro dias após (D4), com análises diárias em D0, D1, D2, D3 e D4. Inicialmente, foram

testados três diluentes: 01. O diluente Beltsville Thawing Solution (BTS - controle); 02. O diluente água de coco em pó (ACP-103[®]), oriundo da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do spray dry (SALGUEIRO et al., 2002), sendo reconstituído com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP + 100 mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80mg/ 100 mL; 03. O leite em pó desnatado (LPD), diluído em água destilada nas seguintes proporções: 10g de LPD + 0,194g de glicose + 100mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80mg/ 100mL. Cada 100g de LPD era composto por: carboidratos (56g); proteínas (20,8g); fibra solúvel (9,6g); sódio (300mg); cálcio (2g); ferro (17,2mg); vitaminas A (564µg), D (6µg), E (18,8mg) e C (92mg) e ácido fólico (480µg). Esses três diluentes foram submetidos a temperatura de conservação de 17 °C. A cada dia de análise, foram retirados os tubos equivalentes a cada ejaculado/tratamento, incubados a 39 °C por 10 minutos.

Na etapa II do experimento foi utilizado o melhor diluente da etapa I adicionado de três diferentes concentrações de ácido fólico (Sigma P8810). Foi separado de cada ejaculado um total de $2,1 \times 10^9$ spz, repartido equitativamente entre quatro tratamentos (35×10^6 spz/mL), com um volume final por tratamento de 12,5 mL, envazados em cinco tubos de ensaio/tratamento ($2,5\text{mL} = 87,5 \times 10^6$ spz/tubo). O dia da coleta foi considerado dia zero (D0) e o sêmen foi conservado até quatro dias após (D4), com análises diárias em D0, D1, D2, D3 e D4. Onde o BTS sem adição do ácido fólico foi considerado como tratamento controle (T1); BTS + 175µM de ácido fólico (T2); BTS + 350µM de ácido fólico (T3); e BTS + 525µM de ácido fólico (T4); com a finalidade de testar a possível ação do ácido fólico e uma concentração ideal do mesmo.

03. Análises do sêmen pós-diluição

3.1. Análises de vigor e motilidade

Para a avaliação da qualidade espermática, foi analisado o vigor espermático (0 a 5) (TONIOLLI, 1996) e a porcentagem de células móveis (%), colocando-se uma gota de sêmen de 15µL entre lâmina e lamínula, com leitura em microscopia óptica a um aumento de 200 vezes. O sêmen diluído e conservado a 17 °C e foi reaquecido a 39 °C, com leituras feitas após 10 minutos de incubação.

3.2. Integridade do acrossoma e vitalidade

Para a análise de integridade do acrossoma e de vitalidade (% de espermatozoides vivos), esfregaços de sêmen foram feitos no D0 (após seis horas de conservação) e no D4. Em ambos os momentos, o sêmen era reaquecido a 39 °C durante 10 minutos antes das análises, onde eram consideradas a integridade do acrossoma e a vitalidade. Foram contadas 200 células

por esfregação corado, em microscopia óptica com lente de imersão (aumento de 1000x). A solução corante utilizada foi formada por: azul de bromofenol = 0,1g; citrato de sódio = 0,4g; água destilada = 10mL. Juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante sendo homogeneizada em seguida. Após 30 segundos, procedeu-se ao esfregação, sendo secado à temperatura ambiente. Para análises, os espermatozoides foram classificados em quatro categorias: 1) Vivos com acrossoma intacto; 2) Vivos com acrossoma danificado; 3) Mortos com acrossoma intacto; 4) Mortos com acrossoma danificado.

3.3. Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico também foi realizado nos dias D0 e D4, e permitiu a avaliação da qualidade da membrana do espermatozoide, através de uma prova de resistência ao choque osmótico. A técnica consistiu da adição de 1 mL de sêmen diluído em 15 mL de água destilada e mantidos por 15 minutos em banho-maria a 39 °C (solução A). Após o período de incubação, adicionou-se 0,5 mL de formal salino a 1% (solução B) em um volume de 1 mL da solução A, retirando-se em seguida uma alíquota de 15µL, colocada em uma lâmina, recoberta por lamínula e em seguida levado ao microscópio óptico com um aumento de 400x, sendo contados um total de 200 espermatozoides. O espermatozoide com a cauda reta é indicativo de ruptura de membrana, os que permanecerem com membrana íntegra apresentam cauda enrolada. Um bom sêmen deve ter no mínimo 50% de espermatozoides com cauda enrolada.

04. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso, usando-se análise de variância e aplicando-se os testes Mann Whitney, para a comparação entre grupos, e Qui-Quadrado, corrigido para os resultados expressos em porcentagem, usando-se o Programa StatView (versão 5.0.1; SAS Institute Inc. 1992-1998) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ETAPA I

A fração espermática do sêmen *in natura* dos 60 ejaculados analisados do experimento apresentou aspecto normal, coloração branco leitoso, volume médio de 422 mL e concentração média de 237×10^6 spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CORRÊA et al., 2001). O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade média de

87,9%±12,1 e vigor de 4,2±0,6. Estes valores se mantiveram acima dos parâmetros mínimos estipulados pela metodologia para utilização do ejaculado.

Os resultados do vigor espermático nas primeiras 24h de conservação do sêmen, não apresentaram diferenças entre os diluentes ACP-103[®] (2,2±0,8) e LPD (2,3±0,8), porém, no BTS (1,7±0,7) houve uma queda significativa desta característica (p<0,05) em relação aos outros dois diluentes. Por outro lado, a partir de D2, o BTS apresentou melhores valores para essa característica em relação ao LPD e ACP-103[®], os quais apresentaram uma queda significativa dos valores do vigor espermático. Até 24 horas após início da conservação (D1), o diluente ACP-103[®] apresentou os maiores resultados médios para esta característica, sendo significativamente melhores (p<0,05) do que os demais tratamentos (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram encontrados por ARAÚJO et al. (2012), divergindo apenas no D0 com relação ao ACP-103[®], neste estudo em particular, este diluente obteve resultados significativamente melhores (p<0,05) em D0 quando comparado ao BTS. Desta forma, demonstrou-se que o ACP-103[®] apresentou-se como um meio com uma melhor capacidade de manutenção desta característica nas primeiras 24 horas de conservação do sêmen. Este diluente tem-se mostrado eficiente em diferentes processos biotecnológicos de espécies animais bem como no homem (NUNES; SALGUEIRO, 1999; COSTA et al., 2002), abrindo novas perspectivas para o seu uso.

Os resultados de vigor espermático, permitiram visualizar a possibilidade de utilização destes diluentes alternativos (ACP-103[®] e LPD) na diluição do sêmen do varrão, mas apenas durante uma conservação de 24 horas, uma vez que os resultados alcançados foram significativamente melhores (p<0,05) do que os obtidos pelo BTS. Estes resultados abrem uma nova perspectiva para o uso do sêmen suíno em programas de inseminação artificial, com o uso de matéria prima nacional deixando de ser necessário a importação de componentes ou do diluente BTS pronto.

Tabela 1: Vigor espermático do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

Tratamentos	Dias de conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
BTS	1,7±0,7 ^a	1,5±0,7 ^a	1,4±0,5 ^c	1,2±0,6 ^b	1,1±0,6 ^b
ACP-103[®]	2,2±0,8 ^b	2,3±0,8 ^b	1,0±0,7 ^b	0,2±0,5 ^a	0,1±0,4 ^a
LPD	2,3±0,8 ^b	1,8±0,7 ^{ab}	0,4±0,6 ^a	0,1±0,3 ^a	0,1±0,3 ^a

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

Para a característica de porcentagem de células móveis, o LPD (57,1%) e o ACP-103[®] (51,2%) apresentaram resultados melhores ($p < 0,05$) que o BTS (39,8%) nas primeiras 24h (D1). Por outro lado, este último diluente manteve uma maior porcentagem de células móveis de D2 até o último dia de conservação (D4), resultados esses melhores ($p < 0,05$) em relação aos outros dois diluentes testados (Tabela 2). A conservação do ejaculado suíno no diluente LPD, à temperatura de 17 °C, não se caracterizou como um bom diluente para o sêmen suíno em seu uso prolongado, resultando na deteriorização das características espermáticas, bem como no aparecimento de contaminação bacteriana (KASIMANICKAM et al., 2011). Tais alterações contribuíram para coagular o leite, fato esse que ocorreu com frequência a partir do D2, dificultando a realização das análises e a qualidade de conservação das células.

Em trabalho recente realizado por Barros (2010), a água de coco como diluente na conservação do total de espermatozoides móveis, obteve resultados inferiores aos do presente estudo já no primeiro dia de análise, não indicando o ACP-103[®] como diluente para o sêmen suíno, tendo em vista sua incapacidade na manutenção desta característica. Essas diferenças podem indicar um comportamento individual de cada ejaculado ou de reprodutores em particular, que merecem maiores estudos afim de se determinar possíveis interações com ejaculados ou com indivíduos.

Tabela 2: Total de espermatozoides móveis (% - motilidade) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

Tratamentos	Dias de conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
BTS	39,8±19,5 ^a	29,5±17,0 ^a	25,9±14,7 ^b	20,7±14,6 ^b	21,2±16,9 ^b
ACP-103[®]	51,2±19,6 ^b	42,7±21,4 ^b	26,5±20,3 ^b	4,5±11,4 ^a	2,5±9,6 ^a
LPD	57,1±21,0 ^b	41,7±21,0 ^b	8,8±15,1 ^a	0,8±3,6 ^a	1,6±5,9 ^a

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas ($p < 0,05$)

A porcentagem de espermatozoides vivos em D0 foi maior para o diluente LPD 66,2% do que nos diluentes ACP-103[®] 56,0% e BTS 59,2% ($p < 0,05$), corroborando com o estudo de ARAÚJO et al (2012), onde em D0 o LPD obteve valores significativamente maiores do que os demais diluentes testados. Estes resultados encontrados com o uso do LPD podem ser explicados devido à presença das lipoproteínas e lecitinas do leite, que conferem uma proteção à célula espermática contra o choque térmico, quando adicionadas ao diluente do sêmen antes do resfriamento, fato este que proporciona ao espermatozoide uma maior resistência contra à ação das baixas temperaturas de conservação (FOOTE, 1974; MEMON; OTT, 1981). Porém

em D4 o BTS (35,0%) obteve melhores resultados que nos diluentes LPD 28,7% e ACP-103[®] 22,0% (Tabela 3), sendo significativamente melhores apenas em relação ao ACP-103[®] ($p < 0,05$), justificando o fato de ser o diluente mais utilizado nos programas de inseminação artificial, também pela facilidade de fabricação e baixo preço de comercialização (LEVIS, 2000).

Tabela 3: Total de espermatozoides vivos (%) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

Tratamentos	Dias de Conservação	
	D0	D4
BTS	59,2±17,0 ^a	35,0±16,8 ^b
ACP 103[®]	56,0±15,9 ^a	22,0±11,2 ^a
LPD	66,2±17,3 ^b	28,7±16,0 ^b

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas ($p < 0,05$)

Conforme apresentado na Tabela 4, o LPD e o ACP mantiveram uma maior porcentagem de células com membrana íntegra, 36,1 e 33,5%, respectivamente no primeiro dia de conservação do sêmen, quando comparado ao BTS 24,2% ($p < 0,05$). Já no último dia de análise (D4) os resultados se inverteram, ou seja, o diluente BTS (35%) obteve valores significativamente melhores ($p < 0,05$) que os demais diluentes, LPD (6,2%) e ACP (6,3%). Discordando do observado por Toniolli et al. (2010), onde após o mesmo período, o diluente ACP proporcionou melhores condições de proteção aos espermatozoides ($p < 0,05$), com maior número de células com membrana íntegra (74,2%) em relação ao BTS (39,0%).

Desta forma, estas melhores condições de proteção às células espermáticas permitiram que o sêmen chegasse ao final do período de incubação com um maior número de células com membrana íntegra, fato este que poderá influenciar positivamente nos resultados de fertilidade com o uso de um ejaculado conservado desta maneira. Apesar do período de incubação e da temperatura mais baixa poderem permitir um aumento do número de células mortas e de membranas danificadas, esse tipo de problema foi minimizado quando se utilizou o diluente ACP.

Araújo et al. (2012), não observou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o ACP e o BTS tanto em D0 e D4, discordando do presente estudo, onde o ACP em D4 assim como o LPD ($p < 0,05$) demonstraram um aumento no número de células com membranas danificadas.

Embora este estudo não tenha evidenciado da mesma forma esta qualidade do ACP, tal fato não o descredencia como diluente para o sêmen suíno no tocante a integridade de membrana. No presente trabalho, apesar de a incubação e de temperaturas mais baixas promoverem aumento do número de células mortas e de membranas danificadas, esse tipo de evento foi minimizado quando se utilizou o BTS.

Tabela 4: Total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

Tratamentos	Dias de Conservação	
	D0	D4
BTS	24,2±10,8 ^a	13,6±8,2 ^b
ACP-103[®]	33,5±12,2 ^b	6,3±5,9 ^a
LPD	36,1±12,5 ^b	6,2±5,6 ^a

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

Diante dos resultados concluímos que o melhor diluente a ser utilizado na II etapa foi o BTS por se manter mais estável pelos cinco dias de conservação a 17 °C, apesar do LPD e ACP terem sido melhores nas primeiras 24h.

ETAPA II

A fração espermática do sêmen *in natura* dos 60 ejaculados analisados do experimento apresentou aspecto normal, coloração branco leitoso, volume médio de 340 mL e concentração média de 275 x10⁶ spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CORRÊA et al., 2001). O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade média de 88%±7,8 e vigor de 4,2±0,5. Estes valores se mantiveram acima dos parâmetros mínimos estipulados pela metodologia para utilização do ejaculado.

Resultados de vigor espermático encontram-se na tabela 5. Entre os tratamentos analisados não houve nenhuma diferença significativa (p>0,05). Porém, foi observado que, dentro de cada dia de conservação do sêmen, o uso de concentrações maiores do ácido fítico proporcionou uma queda mais lenta nos resultados médios do vigor espermático. Esta tendência pode indicar a possibilidade de que maiores concentrações do ácido fítico adicionados ao diluente de sêmen suíno, poderá apresentar melhores resultados de vigor espermático, entretanto, esta tendência ainda precisa ser confirmada através de experimentos suplementares.

Tabela 5: Vigor espermático do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fólico.

Tratamentos	Dias de conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
T1	2,3±0,9 ^a	2,0±0,7 ^a	1,9±0,7 ^a	1,7±0,7 ^a	1,5±0,7 ^a
T2	2,3±0,9 ^a	2,1±0,7 ^a	1,9±0,7 ^a	1,7±0,6 ^a	1,5±0,6 ^a
T3	2,5±0,9 ^a	2,0±0,8 ^a	1,9±0,7 ^a	1,8±0,7 ^a	1,7±0,7 ^a
T4	2,6±0,7 ^a	2,2±0,7 ^a	2,0±0,7 ^a	1,8±0,7 ^a	1,7±0,7 ^a

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

Para a característica percentagem de células móveis (Tabela 6) em D0, D1 e D4, a concentração de 525 µM (T4) obteve um aumento significativo com relação ao tratamento controle (T1).

Em estudo feito com outro antioxidante (Trolox) adicionado ao BTS, apresentou melhores resultados médios motilidade espermática em relação ao controle (TONIOLLI; TONIOLLI, 2010). O efeito benéfico de antioxidantes sobre o total de células móveis na conservação de sêmen foi observado por Sarlós et al., (2002) no sêmen ovino. Segundo os autores, esse efeito se deve à alta capacidade do antioxidante em inibir a lipoperoxidação.

Tabela 6: Total de espermatozoides móveis (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fólico.

Tratamentos	Dias de conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
T1	47,5±19,9 ^a	39,1±17,0 ^a	35,1±14,2 ^a	27,9±13,1 ^a	23,1±12,8 ^a
T2	49,3±21,5 ^{ab}	41,3±18,1 ^{ab}	35,5±16,8 ^a	30,1±12,9 ^a	24,5±12,8 ^{ab}
T3	50,9±22,8 ^{ab}	40,4±18,8 ^{ab}	35,1±16,1 ^a	31,4±14,3 ^a	26,8±12,7 ^{ab}
T4	55,6±17,2 ^b	46,0±16,7 ^b	37,3±15,9 ^a	32,4±14,9 ^a	28,9±13,1 ^b

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

Os resultados do total de espermatozoides vivos (Tabela 7) não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) entre os tratamentos utilizados, porém, como foi visto na característica vigor espermático, à medida que se utilizava maiores concentrações de ácido fólico adicionada ao meio diluente, observou-se uma queda mais lenta na percentagem média de células vivas. Esta tendência de resultados pode indicar uma ação protetora do ácido fólico, que manteve-se estável entre o primeiro e último dia de conservação, entretanto, uma verdadeira e constante

ação protetora, relacionada a uma determinada concentração do ácido fólico, ainda precisa ser melhor determinada. Já em estudo realizado por Peixoto et al. (2007), a adição de vitamina C (600 µM/L) e Trolox (60 µM/L) proporcionaram maior proteção às membranas acrossomais de espermatozoides ovinos, bem como com os resultados de Beconi et al. (1993), que obtiveram maior percentual de espermatozoides com acrossoma intacto ao adicionarem as vitaminas C (5 mM de ascorbato) e E (1,0 mg/mL acetato de α -tocoferol) ao diluente de sêmen bovino. No presente trabalho, apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos, ocorreu uma tendência de uma menor queda no número de espermatozoides vivos com acrossoma intacto quando a concentração de ácido fólico era maior. As diferenças encontradas entre os resultados deste trabalho em relação aos dos autores citados, podem ser devido a diferenças entre substâncias utilizadas bem como com a espécie animal em questão.

Durante o processo de maturação, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma, limitando sua defesa contra o estresse oxidativo e tornando-os dependentes dos antioxidantes presentes no plasma seminal (BAUMBER et al., 2005), evidenciando a importância da utilização de substâncias antioxidantes ao diluente, de forma a proporcionar um maior número de células vivas após o processo fisiológico, que possam alcançar o óvulo em condições de fertilização.

Tabela 7: Total de espermatozoides vivos (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fólico.

Tratamentos	Dias de Conservação	
	D0	D4
T1	55,1±10,7 ^a	38,3±10,1 ^a
T2	56,5±9,5 ^a	40,4±10,7 ^a
T3	56,6±10,8 ^a	40,5±10,8 ^a
T4	57,9±12,1 ^a	42,3±10,3 ^a

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

Em relação ao teste hiposmótico, o tratamento com a maior concentração de ácido fólico (T4), obteve melhor resultado (p<0,05) quando comparado com o controle tanto em D0 quanto em D4, produzindo assim efeitos benéficos sobre a porcentagem de células com membrana íntegra.

Estudos têm mostrado que a vitamina E (α -tocoferol) é capaz de proteger as células de estresse oxidativo (TIRADO; BROWN, 2005) e de danos das membranas plasmática e

acrossomal (MAIA, 2006). Os resultados do presente estudo corroboram com estas afirmações, já que foi obtido com o uso das maiores concentrações de ácido fítico adicionado ao diluente do sêmen, os melhores resultados ($p < 0,05$) de proteção das células contra os danos oxidativos sobre a membrana plasmática.

Tabela 8: Total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico.

Tratamentos	Dias de Conservação	
	D0	D4
T1	34,4±9,3 ^a	25,4±6,9 ^a
T2	36,7±10,7 ^{ab}	28,29±7,9 ^{ab}
T3	36,9±9,9 ^{ab}	28,31±7,7 ^{ab}
T4	40,1±10,3 ^b	28,58±7,3 ^b

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas ($p < 0,05$)

CONCLUSÃO

O LPD e o ACP mostraram ser excelentes meios diluentes para o sêmen suíno, desde que utilizados por um período de até 24 horas de conservação à temperatura de 17 °C. Já a adição do ácido fítico ao diluente BTS não apresentou muita influência sobre os parâmetros analisados, exceto sobre a percentagem de espermatozoides móveis e integridade de membrana. Portanto, através de novos protocolos experimentais, maiores estudos devem ser conduzidos visando elucidar se efetivamente existem efeitos do ácido fítico sobre o metabolismo espermático e como os mesmos podem ser expressos na prática em termos de qualidade do espermatozoide suíno.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.R.S. **Uso de diluentes alternativos a baixas temperaturas na manutenção da qualidade espermática do sêmen suíno**. 93f. 2012. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 2012. Disponível em: <<http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/linaraquel.pdf>>. Acesso em: 10/04/2013.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, p. 772–779, 2005.

BARROS, T.B. **Qualidade espermática do sêmen suíno conservado a baixas temperaturas em diluentes alternativos**. 66f. 2010. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 2010. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/tatyane_barros.pdf>. Acesso em: 10/05/2012

BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 841, 1993

BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.9, n.3, p.165-191, 2008.

CARDOSO, R. de C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. da. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. **Ciência Rural**, v. 32, n.4, p. 657-661, 2002.

CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. Copyright. Pelotas, Brasil, 2001, 194p.

COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L. et al. Preservation of goat pre-antral follicles in saline or coconut water solution. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.324-330, 2002

FAGUNDES, B.; SILVA, J.F.S.; SHIMOYA, A.; CUNHA, I.C.N. DA; SOUZA, G.V, DE; TILBURG, M.F. VAN. Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.279-284, 2010.

FOOTE, R. H. Artificial Insemination. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. Philadelphia: Ed. Lea and Lebigger, 1974, p.409-431

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**. United Kingdom, v. 8, n. 1, p. 61-69, 1990.

JEONG, Y-J; KIM, M-K.; SONG, H-J; KANG, E-J; OCK, S-A.; KUMAR, B.M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**. v. 58, p. 181–189, 2009

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 143-172. 2000.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A. PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. **Small Ruminant Research**. v.99, p.208– 213. 2011

LINDEBERG, H.; KURTEN, A.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Freezing of stallion semen with addition of glycine betaine. **Journal of Veterinary Medicine**. Serie A, v. 46, p; 87-90, 1999.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase.** 2006, 147f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MEIRELES, L.S.; MALSCHITSKY, E.; NEVES, A.P.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A. de; GARBADE, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para a preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Veterinária Ciência Rural**, v. 28, n.3, p. 467-470, 1998.

MEMON, M. A.; OTT, R. S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. **World Review of Animal Production**. v.17, n.1, p.19-25, 1981.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C. de M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.1, n.1, p. 17-26, 1999.

PACHECO, G.D. et al. Utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado, como fonte de fitato, associado à fitase em rações de suínos: efeitos sobre a qualidade da carne e da linguiça tipo frescal. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 819-828, abr. 2012

PEIXOTO, A.L.V. de A. **Efeito da adição de Vitamina C e Trolox ao diluidor utilizado para criopreservação de sêmen ovino.** 2007. 94p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.1000 p.

TIRADO, E.E.; BROWN, D.B. Oxidative Stress: Protective Effects of 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman- 2-Carboxylic Acid (Trolox) on Human Sperm Activation. **Fertility & Sterility – Abstracts**. v. 84, Suppl. 1, p. 226-227, 2005.

TONIOLLI, R.; JATAHY, P.C.; SILVA, M.C.; MOREIRA, F.R. da C. Utilização do leite desnatado e do ácido 3-indol acético na conservação do sêmen suínos. **Ciência Animal**, v.11, n.1, p.21-26, 2001.

TONIOLLI, L. de S.; TONIOLLI, R. Diferentes concentrações de trolox e sua ação sobre parâmetros qualitativos do sêmen suíno. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 15, 2010. Fortaleza. **Anais eletrônicos....** Disponível em: <<http://semanauniversitaria.uece.br/anais/paginas/trabalhos.jsf>> Acesso em: 10/08/2012

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C.. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação in vitro e in vivo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1072-1079, 2010.

WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **PIGS - Misset**, 8:22-23. 1992

08 CAPÍTULO III

**Uso do ácido fítico adicionado ao diluente BTS na conservação
do sêmen do varrão: avaliação *in vivo***

*Use of phytic acid added to BTS extender in the conservation
of boar semen: in vivo evaluation*

Aline Viana Dias, Daianny Barboza Guimarães, Lina Raquel Santos Araújo, Ludymila
Furtado Cantanhêde, Tatyane Bandeira Barros, Ricardo Toniolli

Uso do ácido fítico adicionado ao diluente BTS na conservação do sêmen do varrão: avaliação *in vivo*

Use of phytic acid added to BTS extender in the conservation of boar semen: in vivo evaluation

Aline Viana Dias¹, Daianny Barboza Guimarães¹, Lina Raquel Santos Araújo², Ludymila Furtado Cantanhêde¹, Tatyane Bandeira Barros¹, Ricardo Toniolli³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE; ²Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LabSuis)/UECE; ³Orientador, LabSuis – FAVET/UECE, Av. Paranjana, 1700 – Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000, e-mail: toniolli@roadnet.com.br

RESUMO

A manutenção do sêmen suíno sob condições de refrigeração tem se mostrado uma técnica eficiente para a difusão do material genético através dos programas de inseminação artificial. O uso de várias substâncias adicionadas ao diluente como antioxidantes, vem sendo utilizados na conservação do sêmen de diversas espécies domésticas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do ácido fítico adicionado no diluente sob a forma refrigerada, por meio de resultados de fertilidade de fêmeas inseminadas. Foram utilizados 4 reprodutores (Agrocercos Topigs) para a inseminação artificial e foram utilizadas 282 fêmeas adultas na formação dos lotes, o experimento foi realizado no decorrer de 7 semanas, com os lotes de inseminação formados com o sêmen diluído em BTS (247 fêmeas) e BTS adicionado de ácido fítico (525µM/100mL) (35 fêmeas). Na avaliação dos resultados de fertilidade e prolificidade, usaram-se as seguintes características: 1) total de fêmeas inseminadas; 2) número total de leitões/leitegada; 3) porcentagem de porcas paridas; 4) média de leitões nascidos vivos/porca. Observou-se que a taxa de fertilidade entre as porcas inseminadas com BTS e BTS + ácido fítico diferiram 9 pontos percentuais 85,2 e 94,3% respectivamente. Ao se comparar o peso médio de leitões ao nascer e peso da leitegada em porcas inseminadas com BTS ou em BTS + ácido fítico, pôde-se verificar que ambos apresentaram resultados semelhantes, sem diferença estatística significativa entre os dois tratamentos ($p>0,05$). A adição do ácido fítico ao diluente BTS apresentou ser favorável à manutenção das células espermáticas e de seu potencial fecundante, favorecendo, assim, uma maior taxa de fertilidade.

Palavras-chave: sêmen suíno, ácido fítico, BTS, antioxidante

ABSTRACT

The maintenance of boar semen under refrigerated conditions has proven an effective technique for the diffusion of genetic material through artificial insemination programs. Various substances added to the diluent, such as antioxidants, have been used in the preservation of semen from several domestic species. The aim of this study was to evaluate the effect of phytic acid added to the diluent in refrigerated form, through fertility outcomes of inseminated females. 4 boars (Agroceres Topigs) were used for artificial insemination and 282 adult females were used in the formation of lots. The experiment was conducted over seven weeks, with lots of insemination created with semen diluted in BTS (247 females) and BTS with phytic acid (525 μ M / 100mL) (35 females). Assessing the results of fertility and prolificacy, the following characteristics were used: 1) total of inseminated females, 2) total number of piglets / litter, 3) percentage of calved sows; 4) average piglets born alive per sow. It was observed that the fertility rates of sows inseminated with BTS and BTS + phytic acid have a difference between them of 9 percentage points, 85.2 and 94.3% respectively. When comparing the average weight of piglets at birth and litter weight in sows inseminated with BTS or BTS + phytic acid, it was observed that both showed similar results, with no statistically significant difference between the two treatments ($p>0.05$). The addition of phytic acid to BTS proved to be conducive to maintaining the sperm cells and fertilizing potential, thus favoring a higher fertility rate.

Keywords: swine semen, phytic acid, BTS, antioxidant

INTRODUÇÃO

A produção nacional de carne suína, em 2012 cresceu 2,58% em relação a 2011, passando de 3,40 milhões para 3,49 milhões de toneladas, sendo o terceiro maior produtor e quarto maior exportador de carne suína do mundo (ABIPECS, 2012) e se encontra anualmente em constante crescimento. Com isso, a suinocultura brasileira cresce em qualidade e volume de produção utilizando-se de novas tecnologias.

Na tentativa de reduzir os custos envolvidos na cadeia produtiva, bem como o aumento do padrão genético e da qualidade do produto final, foi introduzida na suinocultura a prática da inseminação artificial (IA) (CASTAGNA et al., 2001). No Brasil, a IA em escala comercial foi introduzida somente a partir de 1975, principalmente na região sul do país, devido a uma forte

concentração de criadores com alto nível de tecnificação, além de taxas elevadas de produtividade (SCHEID, 1992).

A manutenção do sêmen suíno sob condições de refrigeração tem se mostrado uma técnica eficiente para a difusão do material genético através dos programas de inseminação artificial. Quando o sêmen é adequadamente processado, é possível a obtenção de altos resultados de fertilidade e de prolificidade, com resultados no mínimo, semelhantes aos obtidos com o uso da monta natural (BORTOLOZZO et al., 2005).

Numerosos trabalhos têm sido efetuados com a finalidade de desenvolver um diluente para o sêmen de diferentes machos domésticos. O uso de várias substâncias adicionadas ao diluente, tais como diferentes antioxidantes (JEONG et al., 2009), crioprotetores e aminoácidos (LINDEBERG et al., 1999; FAGUNDES et al., 2010) vem sendo utilizados na conservação do sêmen de diversas espécies animais.

A célula espermática possui grande sensibilidade às espécies reativas ao oxigênio, podendo este fato ser explicado por duas razões: a primeira, pela quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes em sua membrana plasmática e a segunda, pelas baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (AITKEN; FISHEL, 1994), justificando assim a utilização dos antioxidantes adicionados aos diluentes de sêmen, na tentativa de minimizar os efeitos deletérios sobre os espermatozoides.

O ácido fítico presente em grandes concentrações no farelo de germen de milho desengordurado, é visto como um potente antioxidante natural, capaz de inibir a formação de radicais livres ao ser veiculado através desses ingredientes nas rações. (BOHN et al., 2008). O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do ácido fítico adicionado no diluente de sêmen conservado sob a forma refrigerada, através dos resultados de fertilidade e prolificidade de fêmeas inseminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

01. Reprodutores e coleta de sêmen

Foi utilizado o sêmen de 4 reprodutores (Agroceres Topigs) para a inseminação artificial, animais estes que se encontravam em coleta regular e apresentavam boa saúde. Os machos eram alimentados com ração balanceada de boa qualidade, com os níveis proteicos (16%), energéticos (4,5%) e minerais dentro dos padrões estipulados para reprodutores em

sistema de trabalho e água à vontade. A coleta foi realizada pela técnica da mão enluvada em recipiente coberto por filtro e protegido por copo térmico. Foi aproveitado o ejaculado total após a separação da parte gelatinosa. Os reprodutores utilizados e as inseminações artificiais foram realizadas na Granja Suinícola Regina, no município de Maranguape-CE.

A qualidade do ejaculado de cada reprodutor em cada coleta, foi avaliada pelas seguintes características: concentração ($\times 10^6$ spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996) e total células móveis (% - motilidade). Só foram aproveitados para a produção das doses inseminantes, os ejaculados que apresentassem valores de $\geq 3,0$ para o vigor e $\geq 80\%$ de espermatozoides móveis.

02. Inseminação Artificial

Neste trabalho foi utilizado um total de 285 fêmeas adultas na formação dos lotes de inseminação. O experimento foi realizado no decorrer de 7 semanas, com os lotes de inseminação artificial (IA) formados da seguinte maneira: 01) com o sêmen diluído em BTS (T1 – controle, n = 250); 02) BTS adicionado de ácido fítico ($525\mu\text{M}$ / 100mL – T2, n = 35). Cada fêmea recebeu três inseminações por cio com um total de $3,5 \times 10^9$ spz/IA. Os intervalos entre IA foram de 12 horas, com os seguintes tempos contados após a fêmea apresentar reação positiva ao reprodutor e tratador: Primeira IA = 24 horas; segunda IA = 36 horas; terceira IA = 48 horas.

Os resultados de fertilidade e prolificidade também foram tratados de acordo com a ordem de parto as fêmeas e foram divididas em três categorias: 01) Ordem de parto (OP) 2 – 3; 02) OP 4 – 5; 03) OP ≥ 6 . Os dados das fêmeas incluídas no trabalho foram extraídos dos relatórios do banco de dados da granja suinícola Regina. Todas as fêmeas recebiam 2,0 kg/dia de ração (gestação) até 85 dias de cobertas, após os quais até 114 dias de gestação receberam 3,0 kg/dia de ração (gestação), em seguida a ração gestação era substituída pela ração de lactação.

03. Avaliação da fertilidade e prolificidade

Na avaliação dos resultados de fertilidade e prolificidade, usaram-se as seguintes características: 1) total de fêmeas inseminadas; 2) porcentagem de porcas paridas; 3) número total de leitões/leitegada; 4) média de leitões nascidos vivos/porca.

04. Análise Estatística

Para a descrição dos resultados, foram empregados as médias e os desvios padrão (média \pm desvio padrão) dos dados originais. O teste proposto foi o Qui-quadrado corrigido para a comparação entre grupos usando o programa Stat View (versão 5.0.1; SAS Institute Inc. 1992-1998). Para a significância estatística foi utilizado um intervalo de confiança $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de fertilidade e prolificidade estão expressos na Tabela 1, onde pode-se observar que a taxa de porcas inseminadas e paridas com BTS e BTS + ácido fólico diferiu de 9,1 pontos percentuais, com valores de 85,2 e 94,3%, respectivamente.

Sabe-se que a taxa de parição em uma granja comercial deve-se alcançar valores iguais ou superiores a 90% (SILVEIRA, 2007), de forma à obtenção de resultados economicamente viáveis, fato este não encontrado no presente trabalho com o uso do diluente BTS (85,2%). Já com a adição do ácido fólico no meio diluente, os resultados foram excelentes, garantindo uma ótima relação custo x benefício para o criador. Entretanto, também é sabido que a taxa de parição pode ser influenciada por fatores específicos causadores de diferentes falhas reprodutivas (não relacionadas ao sêmen), além de outras variáveis externas (SILVEIRA, 2007), o que pode explicar a baixa percentagem desta característica nos resultados com o uso do diluente BTS.

Um exemplo destas falhas pode ser, quando porcas que deveriam ser descartadas por diferentes razões, como a idade, são cobertas para atingir a meta de coberturas semanais, aumentando-se a probabilidade de falhas de concepção com prejuízo para a taxa de parição. Porcas recobertas após terem tido um retorno de cobertura apresentaram comprometimento da taxa de parto com 11 pontos percentuais a menos do que as fêmeas de primeiro serviço (76,0 % vs. 87,1 %) e porcas cobertas após dois retornos apresentaram taxa de parto de 40,1 % (VARGAS et al., 2006). Estes tipos de fatos que acontecem normalmente em granjas comerciais, podem ter influenciado nos resultados das inseminações artificiais deste trabalho. Uma granja com bom equilíbrio da estrutura de idades das matrizes do plantel deve apresentar uma percentagem de 53,0% de matrizes entre a ordem de parto (OP) 3 e OP 6. (SILVEIRA, 2007).

Desta forma, o presente resultado pode indicar que a adição do ácido fítico ao diluente BTS sobre a conservação do sêmen suíno, apresentou características favoráveis à manutenção das células espermáticas e de seu potencial fecundante, demonstrado pela melhor taxa de fertilidade (94,3%), acima dos índices mínimos indicados pela literatura (SILVEIRA, 2007) para os resultados de produtividade que uma granja comercial deve obter.

Tabela 1: Resultados de fertilidade e prolificidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído em BTS e BTS + ácido fítico (525 μ M / 100mL).

TRATAMENTOS	FERTILIDADE			PROLIFICIDADE	
	(+)	(-)	(%)	TOTAL	VIVOS
PORCAS BTS	213	37	85,2	12,6	11,7
PORCAS BTS + AF	33	2	94,3	10,9	9,9

Na Tabela 2, observou-se que fêmeas positivas para gestação inseminadas com BTS+AF, em sua maioria (51,5%) eram de OP ≥ 6 , diferente do tratamento controle onde foram inseminadas apenas com o BTS e que em sua maioria (46,9%) eram de OP 2-3. Podendo ter contribuído para um menor número de leitões nascidos como pode ser visto na tabela 3.

Tabela 2: Fêmeas com diagnóstico positivo de gestação, inseminadas com os diluentes BTS e BTS + AF de acordo com a ordem de parto (%).

OP	BTS			BTS + AF		
	2 – 3	4 – 5	≥ 6	2 – 3	4 – 5	≥ 6
%	46,9	26,3	26,8	27,3	21,2	51,5

De acordo com os resultados expressos na Tabela 3, ao se comparar o peso médio de leitões ao nascer e peso da leitegada em porcas inseminadas com BTS ou com BTS+AF, pôde-se verificar que em ambos os tratamentos os resultados foram semelhantes, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos ($p > 0,05$). Estes tipos de características, devido possivelmente ao fato de que dependem mais das fêmeas do que do tipo de conservação do sêmen, não apresentaram diferenças entre os resultados dos tratamentos testados.

Porém, com relação ao número total de leitões nascidos vivos, observou-se 1,8 leitões a mais no lote de porcas inseminadas com BTS (11,7) em relação ao lote com BTS+AF (9,9). Este resultado de fertilidade com o uso do ácido fólico, ficou com valores inferiores aos recomendados para uma suinocultura tecnificada que seria de 10 a 12 leitões/porca (CRESTANI, 1995). Por outro lado, deve ser levado em consideração que essa diferença pode ser explicada pela influência de um maior número de porcas (51,5%) com OP avançada (≥ 6), presentes no tratamento BTS+AF, uma vez que um número máximo de partos de uma fêmea afim de que ela ainda permaneça no plantel reprodutivo de uma granja seria de 6, para que ainda consiga resultados economicamente viáveis (LUCIA et al., 1997).

Estudos da estimativa de parâmetros genéticos vinculados à característica leitões nascidos vivos, durante o período de seis parições consecutivas de porcas, observaram uma tendência de aumento da leitegada até a quarta parição, declinando estes valores na sequência de gestações (RIBEIRO et al, 2008; LEITE et al., 2008). As observações destes autores, podem explicar o fato de que, mesmo obtendo valores superiores de fertilidade, as fêmeas inseminadas com BTS+AF apresentaram uma prolificidade inferior, influenciada provavelmente pelo maior número de fêmeas com OP ≥ 6 utilizadas neste tratamento.

No presente estudo, apesar dos lotes terem sido formados aleatoriamente, acabou acontecendo um desequilíbrio no tratamento BTS+AF, no qual um maior número de fêmeas mais velhas foi utilizado para as inseminações artificiais, e desta forma ter influenciado negativamente nos resultados de prolificidade deste tratamento experimental. Outro fato importante a ser considerado, no tocante a produtividade e relação custo x benefício para o criador, é que a manutenção em seu plantel de tais fêmeas pode acarretar a granja prejuízos econômicos.

Tabela 3: Resultados médios de leitões nascidos vivos (LNV), peso médio do leitão (PM) e da leitegada (PML), em fêmeas suínas adultas inseminadas com sêmen diluído em BTS e BTS+AF (525 μ M / 100mL).

Tratamentos	LNV	PM	PML
BTS	11,7	1,53 \pm 0,15 ^a	16,01 \pm 1,8 ^a
BTS+AF	9,9	1,48 \pm 0,11 ^a	14,63 \pm 1,3 ^a

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)

CONCLUSÃO

O ácido fólico adicionado ao diluente BTS parece ter uma ação favorável à manutenção das células espermáticas e de seu potencial fecundante, pelo melhor resultado na taxa de fertilidade. Sua utilização rotineira em programas de inseminação artificial pode ser indicada com possibilidades econômicas melhores. Apesar do tratamento controle ter apresentado 1,8 leitões nascidos vivos a mais, este resultado pode ter sido influenciado pelo maior número de fêmeas com OP ≥ 6 neste lote de animais. Desta forma, trabalhos adicionais devem ser realizados afim de se verificar a eficácia do AF também sobre a característica prolificidade. De qualquer forma a utilização deste antioxidante adicionado ao diluente do sêmen do varrão, abriu novas perspectivas de utilização com a promessa de bons resultados econômicos para os criadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, v.16, p.259-267, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. [2012]. **Relatório ABIPECS 2011**. Available at: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf >. Acessado em: Maio /2013

BORTOLOZZO, F. P. et al. Influence of time of insemination relative to ovulation and frequency of insemination on gilt fertility. *Theriogenology*, v. 64, p. 1956-1662, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada **Suinocultura em Ação**. Porto Alegre, RS: Pallotti, 2005. 185 p.

CASTAGNA, C. D., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. Estratégias de inseminação artificial na suinocultura moderna. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, Porto Alegre, 2001. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA, v. 1, 2001, p.143-150.

CRESTANI, A. M. Visão empresarial da suinocultura contemporânea. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE SUINOCULTURA, 1, 1995, Concórdia. **Anais...** Concórdia: EAF Concórdia, 1995. p. 16-17.

FAGUNDES, B.; SILVA, J.F.S.; SHIMOYA, A.; CUNHA, I.C.N. DA; SOUZA, G.V. DE; TILBURG, M.F. VAN. Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.279-284, 2010.

JEONG, Y-J; KIM, M-K.; SONG, H-J; KANG, E-J; OCK, S-A.; KUMAR, B.M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, v. 58, p. 181–189, 2009

LEITE CDS, LUI JF, ALVES DNM, Pita FVC, Albuquerque LG. Estimativas de parâmetros genéticos para o número de leitões nascidos vivos considerando diferentes partições. In: **Anais do 7º Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**; 2008, São Carlos. São Carlos: SBMA; p. 1-4, 2008.

LINDEBERG, H.; KURTEN, A.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Freezing of stallion semen with addition of glycine betaine. **Journal of Veterinary Medicine Serie A**, v. 46, p; 87-90, 1999.

LUCIA, T. **Lifetime productivity of female swine**. St. Paul: University of Minnesota, 1997. 186p. Dissertation (PhD. in Animal Science), College of Veterinary Medicine, 1997

RIBEIRO JC, CARVALHO LE, SOUSA KC, NEPOMUCENO RC. Prolificidade de fêmeas suínas na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Archivos de Zootecnia**, 220: 537-40, 2008.

SILVEIRA, P.R.S. Fatores que interferem na taxa de partição em rebanhos suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.32-37, 2007

SCHEID, I. R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: Development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, v.26, p.299-301, 1992

VARGAS AJ, WENTZ I, BORTOLOZZO F. Desempenho de fêmeas suínas após apresentarem falhas reprodutivas. In: Seminário Internacional de Aves e Suínos, 5, 2006, Florianópolis, SC. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. v.3, p.25-33. CD-ROM

09 CAPÍTULO IV

Influência da ambiência sobre a qualidade do ejaculado do varrão

Effect of ambience on the quality of boar ejaculated

Aline Viana Dias, Daianny Barboza Guimarães, Lina Raquel Santos Araújo, Ludymila Furtado Cantanhêde, Tatyane Bandeira Barros, Ricardo Toniolli

Influência da ambiência sobre a qualidade do ejaculado do varrão

Effect of ambience on the quality of ejaculated boar

Aline Viana Dias¹, Daianny Barboza Guimarães¹, Ivan Bezerra Quevedo Filho², Lina Raquel Santos Araújo², Ludymila Furtado Cantanhêde¹, Tatyane Bandeira Barros¹, Ricardo Toniolli³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE; ²Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LabSuis)/UECE; ³Orientador, LabSuis – FAVET/UECE, Av. Paranjana, 1700 – Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000, email: toniolli@roadnet.com.br

RESUMO

Quando se fala em ambiência, entende-se como o ambiente no qual o animal vive. A produção animal é o resultado do potencial genético e de suas interações com nutrição, sanidade, manejo e fatores ambientais. O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da ambiência sobre a qualidade do ejaculado do varrão em um período de 12 meses. Foram utilizados 8 varrões mestiços com idade média entre 12 e 36 meses, alojados em baias individuais e submetidos a coletas de sêmen semanais, através da técnica da mão enluvada. Os parâmetros fisiológicos, bem como os dados ambientais foram avaliados três vezes por semana, (manhã e tarde). Os parâmetros fisiológicos estudados foram: temperatura retal (TR) e a temperatura escrotal (TE) e os dados ambientais coletados foram: temperatura ambiente (TA) e umidade relativa do ar (UA). A qualidade do ejaculado foi avaliada pelas características concentração ($\times 10^6$ spzt/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spzt), vigor espermático (0 a 5), total células móveis (motilidade - %). O ano de 2012 foi dividido em trimestres, sendo estes: janeiro a março (E1); abril a junho (E2); julho a setembro (E3); outubro a dezembro (E4). A concentração espermática apresentou maiores valores em E1, acompanhada de um menor volume de sêmen produzido, uma vez que são variáveis com alta correlação negativa. Entretanto, o total de células produzidas por ejaculado foi menor no período E3 que nos demais, porém diferente estatisticamente ($p < 0,05$) apenas do período E4. O vigor espermático manteve-se constante durante todo o ano, já a motilidade espermática em E3, diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em relação aos demais trimestres. A temperatura escrotal e retal aumentaram nos meses com maior umidade (E1 e E2). Sob condições semiáridas, onde não existem estações bem definidas, apenas os períodos seco e chuvoso, não se pôde evidenciar a influência da ambiência sobre a qualidade espermática nem sobre os parâmetros fisiológicos estudados.

Palavras-Chave: ambiência, qualidade espermática, suíno

ABSTRACT

When it comes to ambience, it is understood as the environment in which the animal lives. Livestock production is the result of genetic potential and their interactions with nutrition, health, management, and environmental factors. This study aimed to verify the influence of the ambient on the quality of boar semen in a period of 12 months. 8 crossbred boars were used with an average age between 12 and 36 months, housed in individual cages and subjected to weekly semen collections with the gloved hand technique. Physiological parameters and environmental data were evaluated three times per week, during morning and afternoon. Physiological parameters studied were rectal temperature (RT) and scrotal temperature (TE), environmental data collected were temperature (T) and relative humidity (UA). The quality of the ejaculate was evaluated by the features: concentration ($\times 10^6$ sperm / ml), volume (ml), total sperm ($\times 10^9$ spztz), spermatic vigor (0 and 5) and overall mobile cells (Motility -%). The year 2012 was divided into quarters, which are: January-March (E1), April-June (E2); July-September (E3), October-December (E4). The sperm concentration showed higher values in E1, accompanied by a lower volume of semen produced, since they are variables with high negative correlation. However, the total number of cells produced per ejaculate during E3 was lower than in the others but statistically different ($p < 0.05$) only for the period E4. The spermatic vigor remained constant throughout the year, since sperm motility in E3 decreased significantly ($p < 0.05$) compared to the other quarters. The scrotal and rectal temperatures increased in the months with higher humidity (E1 and E2). Under semi-arid conditions, where there are not well-defined seasons, only the dry and rainy seasons, it was not possible to demonstrate the influence of the ambient on sperm quality nor on the studied physiological parameters.

Keywords: environment, sperm quality, swine

INTRODUÇÃO

A produção nacional de carne suína, em 2012 cresceu 2,58% em relação a 2011, passando de 3,4 milhões para 3,5 milhões de toneladas, sendo o terceiro maior produtor e quarto maior exportador do mundo (ABIPECS, 2012), estando anualmente em constante crescimento. Com isso, a preocupação com a qualidade da carne e com o bem estar animal está cada vez mais presente.

Quando se fala em ambiência, entende-se como o ambiente no qual o animal vive (SOUZA, 2002). A produção animal é o resultado do potencial genético e de suas interações com nutrição, sanidade, manejo e fatores ambientais, verificando-se que muitos animais não conseguem expressar todo o seu potencial produtivo sob as condições adversas do meio ambiente (CURTIS, 1983).

O estresse pode ser definido como uma reação do organismo a qualquer alteração do ambiente, na tentativa de manter a homeostase e no caso de estresse térmico, realizar a termorregulação (FUQUAY, 1981; MACHADO FILHO; HÖTZEL, 2000). Qualquer estímulo ambiental sobre um indivíduo, que sobrecarregue os seus sistemas de controle e reduza a sua adaptação ou tenha potencial para isto, resulta em estresse (FRASER; BROOM, 1990).

As perdas de calor processam-se pelas vias sensível e latente e são denominadas de não evaporativas (sensível) ou evaporativas (latente). Os mecanismos de transferência de calor sensível ocorrem por condução, convecção e radiação. Como o suíno não possui glândulas sudoríparas funcionais, recorre a dois processos básicos para a liberação de calor latente: a respiração e a evaporação de água proveniente dos dejetos líquidos ou existente sobre os pavimentos em que se deitam. (MENDES, 2005).

Os suínos são suscetíveis a elevadas temperaturas devido a sua limitada capacidade de eliminação de calor corporal (EINARSSON et al., 1996), pela presença de tecido adiposo subcutâneo e o reduzido número de glândulas sudoríparas presentes na pele (DYCE et al., 1997), sendo assim mais suscetíveis à ação de uma hipertermia (EDWARDS et al., 1968; BRANDT et al., 1995). A espermatogênese é afetada por altas temperaturas ambientais devido ao aquecimento local dos testículos e ao desequilíbrio hormonal e metabólico, acompanhada por uma diminuição do volume, da concentração e da motilidade espermática, bem como o aumento de células anormais (SYDENSTRICKER, 1993). O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da ambiência sobre a qualidade do ejaculado do varrão em um período de 12 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

01. Reprodutores e coleta de sêmen

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen – FAVET/ UECE, no período de janeiro a dezembro de 2012. Foram utilizados 8 varrões mestiços com idade média entre 12 e 36 meses. Ração de boa qualidade, com os níveis

proteicos, energéticos e minerais dentro dos padrões estipulados para reprodutores em sistema de trabalho (3.150 Kcal de energia metabolizável e 14% de PB). O consumo diário por reprodutor foi de 2,5 Kg/dia em dois arraçoamentos. Os animais estavam alojados em baias individuais e submetidos a coletas de sêmen semanais, através da técnica da mão enluvada.

02. Avaliação da qualidade do ejaculado

A qualidade do ejaculado foi avaliada pelas características de concentração ($\times 10^6$ sptz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptz), vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996), total células móveis (motilidade - %) e temperatura ambiente (°C).

03. Parâmetros fisiológicos e bioclimatológicos

Os parâmetros fisiológicos, bem como os dados ambientais foram avaliados três vezes por semana, em dois turnos as 9:00 e as 15:00 horas, obedecendo às normas meteorológicas internacionais. Os parâmetros fisiológicos estudados foram: temperatura retal (TR) e a temperatura escrotal (TE) que foram medidos por meio de termômetros clínico digital e infravermelho digital, respectivamente. Os dados ambientais coletados foram: temperatura ambiente (TA) e umidade do ar (UA, máxima e mínima), através de termo-higrômetro digital instalado no galpão onde os animais estavam alojados.

O cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) foi realizado segundo a fórmula proposta por Buffington, Collier e Canton (1982), $ITU = 0,8TA + UR (TA-14,3) / 100 + 46,3$, onde TA (°C) e UR (p.100). O ano de 2012 foi dividido em trimestres, sendo estes: janeiro a março (E1); abril a junho (E2); julho a setembro (E3); outubro a dezembro (E4). Segundo Hahn (1985), um valor de ITU inferior ou igual a 70 indica condição normal, não estressante; valores entre 71 e 78 são considerados críticos; entre 79 e 83 indica perigo; e acima de 83 constitui uma situação de emergência.

04. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA, utilizando o General Linear Model (GLM) e posterior comparação de médias e desvio padrão (DP) pelo teste de T a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, a variação da temperatura no interior do galpão no qual os animais estavam alojados, atingiu valores entre 24,4 °C (mínima) e 30,6 °C (máxima);

observados durante os meses de janeiro a dezembro de 2012, respectivamente. A figura 1 apresenta as médias mensais de temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante todo período experimental.

A UA nos meses de fevereiro a abril obteve os maiores valores 78,7; 80,6; 77,9%, respectivamente. A associação desta característica com a elevada temperatura ambiental é mais deletéria para a função testicular, resultando em redução no número de espermatozoides normais e aumento no número de espermatozoides com gota plasmática proximal e distal (SURIYASOMBOON et al., 2005, 2006).

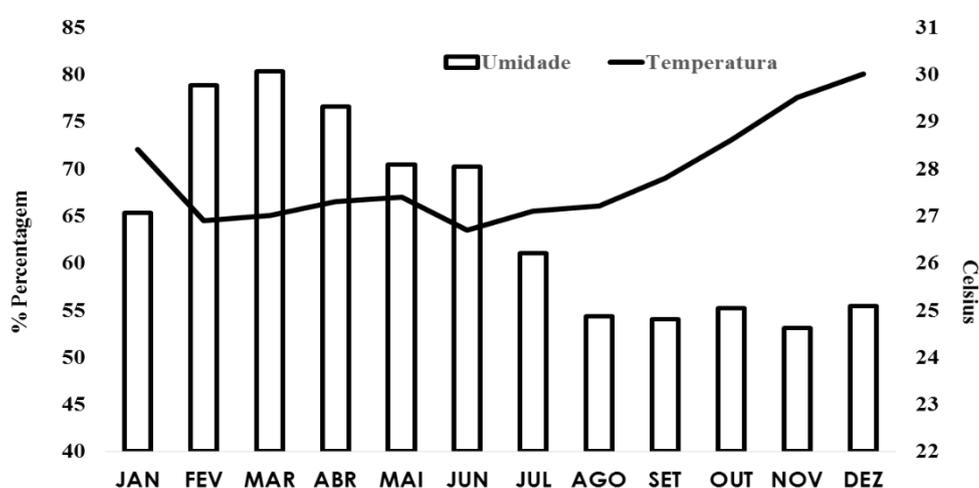


Figura 1. Médias mensais da temperatura ambiente e umidade relativa do ar do galpão de reprodutores suínos, na Universidade Estadual do Ceará, no período de janeiro a dezembro de 2012.

Os 365 ejaculados analisados apresentaram valores médios gerais da seguinte ordem: volume de 263,12 mL, concentração espermática de $353,24 \times 10^6$ spz/mL, vigor espermático = 4,2 e motilidade espermática = 86,9 %.

A concentração espermática expressa na Tabela 1, apresentou maiores valores em E1, essa elevada concentração veio acompanhada de um menor volume de sêmen produzido, uma vez que são variáveis com alta correlação negativa. Entretanto, o total de células produzidas por ejaculado foi menor no período E3 em relação aos demais períodos, porém diferente estatisticamente ($p < 0,05$) apenas do período E4. Similarmente aos resultados do presente trabalho, Ahmad; Noakes (1995; 1996), trabalhando com bodes na Inglaterra, obtiveram a

concentração espermática mais baixa durante a seca e mais alta durante as chuvas, sendo que o volume do ejaculado comportou-se de maneira inversa.

Também na Tabela 1, observou-se que nos períodos com temperatura mais baixa (E1 e E2), a quantidade média de espermatozoides produzidos por ejaculado foi superior à obtida no período mais quente e seco, corroborando com os resultados obtidos por Smital (2009), embora em diferentes condições climáticas, também ocorreram variações sazonais que influenciaram o total de espermatozoides produzidos por ejaculado.

Tabela 1: Valores médios (\pm DP) do volume, concentração espermática, total de espermatozoides, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre (E).

	E1	E2	E3	E4
Volume	240,2 ^a	263,1 ^{ab}	272,3 ^b	270,9 ^b
Concentração	408,3 ^a	372,6 ^b	332 ^c	358,9 ^{bc}
Total sptz	90,3 \pm 24,6 ^{ab}	92,5 \pm 29,2 ^{ab}	87,1 \pm 20,5 ^a	94,6 \pm 29,8 ^b

Letras diferentes nas colunas, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

Na Tabela 2 observou-se que o vigor espermático manteve-se constante durante todo o ano, não sendo detectadas flutuações sazonais desta qualidade seminal. Já, Huang et al., (2000) e Rozeboom et al. (2000), observaram diferenças significativas na qualidade do sêmen suíno em relação às estações do ano, verificando que, nas estações quentes, a qualidade do sêmen declinou significativamente. Com relação a motilidade espermática, em E2 ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais trimestres. Isto pode ter ocorrido devido a variação individual de cada reprodutor e não pela variação de temperatura e umidade relativa, pois à medida que o clima ficava cada vez mais seco e quente, maior foram os valores da motilidade

Em estudo demonstrado por Smital (2009), no período de outono e inverno quando a temperatura é mais amena, a motilidade aumentou ligeiramente, discordando do presente estudo, onde nos trimestres mais quentes (E3 e E4) a motilidade espermática aumentou.

Neste estudo não foram verificadas claras mudanças sazonais em relação a qualidade dos espermatozoides, vigor e motilidade espermática, evidenciadas em outros estudos realizados em locais que possuem a quatro estações bem definidas (CIERESZKO et al., 2000; JANETT et al., 2003).

Tabela 2: Valores médios (\pm DP) do vigor e motilidade espermática, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre (E).

	E1	E2	E3	E4
Vigor	4,2 \pm 0,6 ^a	4,1 \pm 0,7 ^a	4,2 \pm 0,4 ^a	4,2 \pm 0,3 ^a
Motilidade	86,7 \pm 12,0 ^{ab}	82,6 \pm 15,5 ^b	89,4 \pm 5,9 ^a	88,9 \pm 5,3 ^a

Letras diferentes nas colunas, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

As médias de temperatura mínima permaneceram acima da temperatura crítica superior (26 °C) para os suínos durante todo o decorrer do ano (Tabela 3). Segundo Kunavongkrit et al. (2005), calor e umidade elevada podem resultar em estresse crônico, interferindo negativamente na espermatogênese. Para machos suínos, a temperatura ideal situa-se entre 12 e 21 °C, sendo a crítica inferior igual a 12 °C, e a crítica superior igual a 26 °C (PERDOMO et al., 1985).

Tabela 3: Valores médios (\pm DP) da temperatura ambiente, umidade relativa do ar e ITU, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre (E).

	E1	E2	E3	E4
ITU	78,1 \pm 0,8 ^a	77,5 \pm 0,9 ^{ac}	75,7 \pm 0,8 ^b	77,4 \pm 0,4 ^c
T. ambiente	27,44 \pm 1,07 ^a	27,18 \pm 0,53 ^a	27,35 \pm 0,51 ^a	28,80 \pm 0,31 ^b
U. relativa	74,98 \pm 9,92 ^a	72,48 \pm 5,39 ^a	56,41 \pm 3,97 ^b	54,95 \pm 2,31 ^b

Letras diferentes nas colunas, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

Ocorreu aumento na temperatura escrotal nos meses mais úmidos (E1 e E2), como demonstrado na Tabela 4, podendo ser explicado por serem animais que sofrem com o calor, pois, são incapazes de transpirar quando a temperatura do ambiente se aproxima da temperatura corporal, uma vez que sob essas condições o calor só pode ser perdido por evaporação (YOUSEF, 1985). Por serem meses úmidos a troca de calor por evaporação se torna mais difícil e devido ao fato dos suínos terem glândulas sudoríparas afuncionais, o maior componente para aumentar a perda de calor ainda é aumentando a taxa respiratória visto que os suínos são pouco adaptados a condições quentes (LE DIVIDICH et al., 1998).

Tabela 4: Valores fisiológicos médios (\pm DP) da temperatura escrotal e temperatura retal de reprodutores suínos, no período de janeiro a dezembro de 2012, divididos por trimestre (E).

	E1	E2	E3	E4
T. Escrotal	32,40 \pm 0,55 ^a	32,46 \pm 0,55 ^a	31,75 \pm 0,48 ^b	32,02 \pm 0,53 ^c
T. Retal	38,19 \pm 0,40 ^a	38,10 \pm 0,40 ^a	37,86 \pm 0,34 ^b	37,97 \pm 0,27 ^c

Letras diferentes nas colunas, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

A temperatura retal, também visualizada na tabela 4, aumentou nos meses com maior umidade (E1 e E2), entretanto estes valores se encontram dentro da normalidade para a espécie suína, variando de 37,8 a 38,5 °C (RADOSTITS et al., 2002). O Ceará caracteriza-se por ter um clima predominantemente semiárido, a temperatura média é alta durante todo o ano, portanto a oscilação entre as máximas e mínimas é muito pequena.

CONCLUSÃO

Sob condições semiáridas, onde não existem estações bem definidas, apenas os períodos seco e chuvoso, podem ser observadas baixas na produção espermática devido ao estresse térmico, entretanto neste estudo não foi evidenciada sua influência sobre a qualidade espermática nem sobre os parâmetros fisiológicos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, N.; NOAKES, D.E. Seasonal variations in testis size, libido and plasma testosterone concentrations in British goats. **Animal Science**, v.61, p.553-9, 1995.

AHMAD, N.; NOAKES, D.E. Seasonal variations in the Semen quality of young British goats. **The British Veterinary Journal**, v.152, p.225-236, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. [2012]. **Relatório ABIPECS 2011**. Available at: < http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf >. Acessado em: Maio /2013

BRANDT, G., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P., HECK, A.; BONNEMANN, P.E.; GUIDONI, A.L.; UEMOTO, D.A. Efeito da temperatura corporal sobre a eficiência reprodutiva da fêmea suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 1995, Blumenau, SC. **Anais...** Concórdia: ABRAVES e EMBRAPA Suínos e Aves, 1995, 415p. p.129.

CIERESZKO, A.; OTTOBRE, J.S.; GLOGOWSKI, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 89–96, 2000.

CURTIS, S. E. **Environmental management in animal agriculture**. The Iowa State University: Ames, 1983. 410p.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Anatomia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 663p.

EDWARDS, R.L., OMTVEDT, I.T., TURMAN, E.J., STEPHENS, D.F.; MAHONEY, G.W.A. Reproductive performance of gilts following heat stress prior to breeding and in early gestation. **Journal of Animal Science**, v.27, p.1634-1637, 1968.

EINARSSON, S., MADEJ, A., TSUMA, V. The influence of stress on early pregnancy in the pig. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.165-172, 1996.

FRASER, A. F.; BROOM, D. M. **Farm animal behavior and welfare**. Wallingford: CAB International, 1990. 448p.

JANETT, F. THUN, R. BETTSCHEN, S. BURGER, D. HASSIG, M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science**, v.77, p. 213-221, 2003

JOHNSON, H. D.; GOMES, W. R. Effect of elevated ambient temperature on lipid levels and cholesterol metabolism in the ram tests. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 29, p. 469-475, 1969.

HUANG, S.Y.; KUO, Y.H.; LEE, Y.P.; TSOU, H.L.; LIN, E.C.; JU, C.C.; LEE, W.C. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boar. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.231-240, 2000.

KUNAVONGKRIT, A.; SURİYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; HEARD, T. W.; EINARSSON, S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v. 63, p. 657-667, 2005.

LE DIVIDICH, J.; NOBLET, J.; HERPIN, P.;VAN MILGEN, J.; QUINIOU, N. **Thermoregulation**. Progress in Pig Science/ Thrumpton, Nottingham: Nottingham University Press. C1998, p. 229 – 263.

MENDES, A.S. **Efeito do manejo da ventilação natural no ambiente de salas de maternidade para suínos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MUIRHEAD, M.R., ALEXANDER, T.J.L. Managing Pig Health and the Treatment of Disease. A Reference for the Farm. 5M Enterprises, **Sheffield**, pp. 133–226. 1997.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ROZEBOOM, K.; SEE, T.; FLOWERS, B. Coping with seasonal infertility in the herd: part I. 2000. Disponível em: <http://mark.asci.ncsu.edu/Swine_News/2000/sn_v2303.htm>. Acesso em 24 julho. 2012

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 335-346, 2009.

SOUZA, P. **Avaliação do índice de conforto térmico para matrizes suínas em gestação segundo as características do ambiente interno**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 117p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola).

STONE, B. A. Heat induced infertility of boars: the interrelationship between depressed sperm outlet and fertility and an estimation of the critical air temperature above which sperm output is impaired. **Animal Reproduction Science**, v. 4, p. 283-299, 1982

SYNDESTRICKER, K. V. **Análise de Lantermin em edificações para suínos, através de Modelos em escala**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1993. 69p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola).

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

SURIYASOMBOON A.; LUNDEHEIM N.; KUNAVONGKRIT A.; EINARSSON S. Effect of temperature and humidity on reproductive performance of crossbred sows in Thailand. **Theriogenology**, v.65, p.606-628, 2006.

YOUSEF, M.K. **Basic Principles. Stress Physiology in Livestock**. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fl, 1985.

10. CONCLUSÕES GERAIS

- 1) O LPD e o ACP mostraram ser excelentes meios diluentes para o sêmen suíno, desde que utilizados por um período de até 24 horas de conservação
- 2) A adição do ácido fítico ao diluente BTS não apresentou resultados significativos sobre os parâmetros analisados, exceto sobre a porcentagem de espermatozoides móveis e integridade de membrana. Maiores estudos nesse sentido são necessários
- 3) O ácido fítico adicionado ao diluente BTS apresentou uma ação favorável à manutenção das células espermáticas e de seu potencial fecundante, permitindo, assim, uma maior taxa de fertilidade
- 4) Sob condições semiáridas, onde não existem estações bem definidas, apenas os períodos seco e chuvoso, podem ser observadas baixas na produção espermática devido ao estresse térmico, entretanto neste estudo não foi evidenciada sua influência sobre a qualidade espermática nem sobre os parâmetros fisiológicos estudados.

11. PERSPECTIVAS

É de fundamental importância novas pesquisas que busquem diluentes alternativos, compostos adicionados ao meio diluente e que mantenham a viabilidade das células espermáticas de suínos em períodos mais prolongados de conservação. Sendo acessível a todos os tipos de criadores, principalmente os pequenos criadores, visando também um alto valor genético da produção.

Estudos complementares são necessários, incluindo ensaios in vivo, com avaliação de taxas de fertilidade e parição, número de leitões nascidos dentre outros parâmetros que validem os resultados obtidos.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 659- 68, 1995.

ALKMIN, D.V.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; SIQUEIRA, A.P.; MACHADO, G.S.; SILVA, C.L.A.; TARANTINI, T.C. Efeito da porção do ejaculado e do método de resfriamento sobre as características físicas do sêmen suíno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.63 n.6, 2011.

ALMOND, G.W.; BRITT, J.H.; CARR, J.; FLOWER, W.; GLOSSOP, C.; MORROW, M.; SEE, T. **The swine AI book: A field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine**. Editorial Ruth Cronje, North Carolina State University. Raleigh. 1994. 180p.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**. 2 Ed. Editora UFV, p 416, 2001.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.7/8, p.869-880, 1999.

BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.400-407, 2011.

BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.9, n.3, p.165-191, 2008.

BORTOLOZZO F.P. & WENTZ I. Momento e frequência ideal para realizar a inseminação artificial em suínos. Flores da Cunha, 2000. In: III Simpósio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos, 2000, Flores da Cunha, RS. **Anais...** pp.73-78.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. **Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada**. Suinocultura em Ação. Porto Alegre, RS: Pallotti, 2005. 185 p.

CANDINI, P. H.; VIANA, C. H. C.; MADUREIRA, ED. H.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPCÃO, M. E. O. D.; GUSMÕES, P. P. G.; VALENTINE, R.; VISINTIN, J. A. Comparação dos índices reprodutivos com inseminação artificial ou cobertura natural sob influências sazonais em suínos. **Brazilian Journal Veterinary Research. Animal Science**. Vol. 37. n.6. São Paulo Dec. 2000.

CASTAGNA, C. D., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. Estratégias de inseminação artificial na suinocultura moderna. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, Porto Alegre, 2001. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA, v. 1, 2001, p.143-150.

CAVALCANTI, S.S., **Suinocultura Dinâmica**. MZV Editora, Minas Gerais, Brasil, 494p, 1998.

CHAVES, R.N.; TONIOLLI, R.; MORAIS, R.M.; MOREIRA, F.R.C.; DUARTE, A.B.G. Uso da gema de ovo na conservação do espermatozoide suíno a 4 °C, Fortaleza, CE, 2001. In: III Simpósio Cearense de Ciência Animal, 2001, Fortaleza, CE. **Anais...** v.11, n.02, p.111-113.

CHERYAN, M. Phytic acid interaction in food systems. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 13, n. 297, 1980

CORRÊA MN, MEINCKE W, LUCIA JR T, DESCHAMPS JC. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001. 181p.

COSTI, G. **Efeito de diluentes na qualidade de sêmen suíno armazenado a 17°C e no desempenho reprodutivo das fêmeas após inseminação artificial**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DONNELLY, F.T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.F.M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.72, p.484-486, 1999

EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. **Physical activity, fitness and health. Human Kinetics**. Champaign: Illinois, pp.35-42, 1994.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated of red 73 deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.114-118, 2006.

FIREMAN, F.A.T; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1605–1616, 2005.

GADEA, J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, p.17-27, 2003.

GHIRETTI, E.Z.; ZANARDI, E.; NOVELLI, G. et al. Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. **Meat Science**, v. 47, n.1/2, p.167-176, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford, 1999.

JEONG, Y-J; KIM, M-K.; SONG, H-J; KANG, E-J; OCK, S-A.; KUMAR, B.M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, v. 58, p. 181–189, 2009

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A. PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. **Small Ruminant Research**, v.99, p.208– 213, 2011.

KULAKSIZ, R.; ÇEBİÇ.; AKÇAY,E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. **Turkey Journal Veterinary and Animal Sciences**, v.36, n.2, p.177-182, 2012.

KONING, I. **Inseminacion de la cerda**. Zaragoza, Ed. Acribia, 181p., 1979.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. Disponível em: <http://www.sbnpe.com.br/radicais-livres-anti-oxidantes-e-nutricao>, 15 p., 2003

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase**. 2006, 147f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SICHERLE, C.C.; de SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) em diluentes para a criopreservação de sêmen, Curitiba, PR, 2007. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, BH. **Anais...**, 2007. v.17, p.195, 2007.

MIDORIKAWA, K. et al. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, n. 3, p. 552-557, 2001.

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

PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**, v. 2, n. 2, p. 71-79, 1996.

PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. **Journal of Biological Chemistry**. v.130, p.415, 1939.

REIS FT. Coleta, avaliação e manipulação do ejaculado de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.22-29, 1997

RIBEIRO-AZEVEDO, D.M.M.; TONIOLLI, R. Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácido 3-indol acético na conservação do sêmen de caprinos Marota. **Revista Ciência Animal**, v.09, n.01, p.37-42, 1999.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. y ERICSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad en inseminação artificial in suínos. In: Simpósio Internacional Minitub, 3, 2000, Flores da Cunha. **Anais...** Flores da Cunha, 2000. p. 11-33.

ROMERO, C.A.; MARTINEZ, A.R. Tratado de ganado porcino. Madrid, **Nutricion Del Verraco III**, v.62, p.33-41, 2001.

ROBERTSON, L.; PUMMER, J.M.; WATSON, P.F. **The effect of incubation on membrane injury and calcium movement in ram spermatozoa subjected to cold shock**. 11th International Congress in Animal Science and Artificial Inseminations, Dublin, v.1, p.290, 1988.

SAJJADI, M.; CARTER, C.G. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.135-142, 2004.

SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field from its use. **Journal of Dairy Science**, v.24, p.905-910, 1941.

SANCHEZ, R.S. Conceito e fundamentos utilizados na inseminação artificial de suínos. **Suínos & Cia.** v.2, p. 18-22, 2003.

SCHEID, I.R.; WENTS, I.; SOUZA, N.M.; MARIANO, N.M. **Resultados Comparativos da Inseminação Artificial em Suínos com Sêmen Congelado e Resfriado**. Comunicado Técnico. EMBRAPA–CNPSA, Março, 1986, p. 1–2.

SCHEID, I. R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: Development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, v.26, p.299-301, 1992

SCHEID, I.R., Transportando e armazenando corretamente as doses de sêmen. **Suíno & Cia**, n.2, p. 25-31, 2003.

SCOBEY, M.J.; BIELFELD, J.S.; KRUSSEL, J.S.; JEYENDRAN, R.S. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. **Andrologia**, v.27, p.229-231, 1995.

SILVA, T.F.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

SHAMSI, M.B.; VENKATESH, S.; TANWAR, P.; SHARMA, R.K.; DHAWAN, A.; KUMAR, R.; GUPTA, N.P.; MALHOTRA, N.; SINGH, N.; MITTAL, S.; DADA, R. DNA integrity and semen quality in men with seminal antioxidant levels. **Mutat Research**, v.665, p.29-36, 2009.

SOMASUNDAR, P. et al. Inositol hexaphosphate (IP6): A novel treatment for pancreatic cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 126, n. 2, p. 199-203, 2005.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between extenders. **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.

TONIOLLI, R. **Pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation**. Université François Rabelais de Tours – France, These de Doctorat, 91p., 1996.

TONIOLLI, R.; JATAHY, P.C.; SILVA, M.C.; MOREIRA, F.R.C. Utilização do leite desnatado e do ácido 3-indol acético na conservação do sêmen suíno. **Revista Ciência Animal**, v.11, n.01, p.21-26, 2001.

VALENÇA, R.M.B e GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.47-53, 2007.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M., Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and Cancer**, v.55, n.2, p.109-125, 2006.

WEITZE, K.F. The use of "long-term extender" in pig AI– a view of the international situation. **Pig News and Information**, v.11, n.1, p.23- 26, 1990.

WEITZE, K.F. **Timing of artificial insemination in breeding herds I**. Proceeding of 3th Conference International of Boar Semen Preservation, Mariensee, abstract, 1995.

WEMHEUER, W.; STEIBRINK, J.; FUHRMANN, H.; SCHMIDT, F.W.; SALLMAN, H.P. The effect of vitamin A and beta-carotene on the vitamin E status, ejaculation parameters and health of boars used for insemination. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.103, p.431-437, 1996.

WONG, P.Y.Y.; KITTS, D.D. An iron binding assay to measure activity of known food sequestering agents: studies with buttermilk solids. **Food Chemistry**, v.72, n.2, p.245-254 , 2001.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v. 55, n. 6, p. 922-26, 2000.