



**DAIANE MOREIRA SILVA**

**QUANTIFICAÇÃO DE IGF-I NO PLASMA  
SEMINAL DE SUÍNOS E SUA IMPORTÂNCIA  
NA UTILIZAÇÃO APÓS O RESFRIAMENTO E  
CONGELAMENTO DO SÊMEN**

**LAVRAS - MG**

**2010**

**DAIANE MOREIRA SILVA**

**QUANTIFICAÇÃO DE IGF-I NO PLASMA SEMINAL DE SUÍNOS E  
SUA IMPORTÂNCIA NA UTILIZAÇÃO APÓS O RESFRIAMENTO E  
CONGELAMENTO DO SÊMEN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

Coorientadores

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Dr. José Camisão de Souza

**LAVRAS - MG**

**2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Silva, Daiane Moreira.

Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e sua importância na utilização após o resfriamento e congelamento do sêmen / Daiane Moreira Silva. – Lavras : UFLA, 2010.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Varrões. 2. Hormônio. 3. Reprodução. 4. Qualidade seminal.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.089261

**DAIANE MOREIRA SILVA**

**QUANTIFICAÇÃO DE IGF-I NO PLASMA SEMINAL DE SUÍNOS E  
SUA IMPORTÂNCIA NA UTILIZAÇÃO APÓS O RESFRIAMENTO E  
CONGELAMENTO DO SÊMEN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 02 de agosto de 2010.

Dr. José Augusto de Freitas Lima                      UFLA

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli                      UFLA

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo                      UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2010**

*A Deus por sempre estar ao meu lado conduzindo minha vida pelo melhor caminho, por acalantar meu coração nos momentos difíceis e por me dar forças para seguir adiante.*

*À minha mãe, Sônia Maria Moreira da Silva, por sempre ter me incentivado a estudar e a buscar a minha felicidade, por ter chorado comigo todas as vezes em que fui derrotada e principalmente por ter participado de todas as minhas vitórias. Você é muito importante para mim!*

*A Wellington Luiz Cunha da Silva por ter sido meu melhor amigo, companheiro, aconselhador, incentivador e paciente namorado ao longo de todos esses anos. Com certeza teria sido bem mais difícil chegar até aqui sem a sua ajuda e o seu carinho. Muito obrigada por tudo! Amo você!*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo aprimoramento dos meus estudos no Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Fazenda São Paulo, pela disponibilização de animais, laboratório, funcionários, alojamento e alimentação para que fosse concretizado este trabalho. Com certeza todo o trabalho tornou-se gratificante devido à grandiosa ajuda da Fazenda São Paulo.

Ao José Pereira Leite e ao Rodrigo Antônio Carvalho, pelo incessante apoio e pela oportunidade de realização deste trabalho na Granja de Suínos da Fazenda São Paulo.

A todos os funcionários da Fazenda São Paulo, agora meus amigos, pela incomparável ajuda e pela agradável convivência. Agradeço em especial aos funcionários do laboratório de processamento de sêmen: Thiago Augusto Souza Santos, Antônio Marcelo Ferreira, Alessandra Aparecida Lima, Marcelo Monteiro Avelar e Heli Carlos Alves.

À Minitub do Brasil, pela fundamental parceria.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas pela orientação no mestrado, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, por ter me acompanhado e ajudado durante anos. Agradeço também por ter confiado no meu trabalho, por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver este projeto e pela valiosa ajuda com as análises estatísticas.

Ao José Camisão de Souza, co-orientador, pela prontidão em ajudar sempre e pela amizade.

Aos membros da banca de avaliação Prof. Murgas, Prof. Márcio, Prof. Dr. Vinícius Cantarelli de Souza e Prof. Dr. José Augusto de Freitas Lima por terem se disponibilizado a colaborar com este trabalho.

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária, Willian César Cortez, pelo auxílio e amizade.

Aos integrantes do Grupo de Estudos em Reprodução de Suínos da UFLA, pela ajuda em realizar diversos trabalhos, um agradecimento especial ao Luiz Gustavo Pessoa Rocha.

Ao Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende e ao Dr. Pedro Martins Ribeiro Júnior pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da UFLA pela ajuda e por disponibilizar equipamentos para realização de análises.

À laboratorista, Constantina Maria Torres, do Departamento de Ciências dos Alimentos por todos os equipamentos e materiais fornecidos para realização de análises e principalmente pela incessante ajuda.

Aos grandes amigos Anaíse, Natália Ramos, Marlon, Juliana, Natália Nonato, Fabiano, Tália, Gilmara e Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa pelo convívio e também pela disponibilidade em colaborar com o meu trabalho.

À Mirian, Kauê e Ivanise por me ajudarem sempre, sem eu nem precisar pedir. Muito obrigada por terem se tornado minha família, gosto muito de vocês!

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram na concretização deste trabalho e na minha formação.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos analisar a concentração de fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) no plasma seminal, correlacionando-a com os parâmetros seminais *in natura* e avaliar os efeitos da adição deste hormônio no sêmen após o resfriamento e o congelamento. Foram conduzidos três experimentos na Fazenda São Paulo (Oliveira – MG) entre janeiro e maio de 2010. Para a avaliação da correlação entre a concentração de IGF-I no plasma seminal e os parâmetros seminais *in natura*, foram coletados dois ejaculados de 27 varrões pelo método da mão enluvada. Verificou-se que varrões apresentam média de 1,5 ng/mL de IGF-I no plasma seminal e que existe correlação negativa com o teste de vivos e mortos do sêmen *in natura*. Para a avaliação da adição de IGF-I ao sêmen resfriado, sete ejaculados foram coletados de sete animais, dos quais foram feitas doses inseminantes de 100 mL contendo três bilhões de espermatozoides que foram resfriadas a 15 °C. Após 24, 48 e 72 horas de armazenamento, foram adicionadas diferentes concentrações de IGF-I (0, 50, 100 e 150 ng/mL) em alíquotas de 10 mL de sêmen incubado a 37 °C em banho-maria. Foram avaliados a motilidade e o vigor espermático aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação, além do teste de vivos e mortos, resistência osmótica, morfologia, peroxidação lipídica, atividade da glutatona peroxidase e consumo de frutose pelos espermatozoides aos 0 e 120 minutos de incubação. A adição de IGF-I ao sêmen suíno resfriado não alterou a motilidade, o vigor e os parâmetros morfológicos, no entanto, melhorou o teste de vivos e mortos, a resistência osmótica, a peroxidação lipídica, a atividade da glutatona peroxidase e piorou o consumo de frutose. Concluiu-se que a adição de 100 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno resfriado proporciona melhoria nos parâmetros seminais. Para a avaliação da adição de IGF-I ao sêmen descongelado, sete ejaculados procedentes de sete animais foram processados em palhetas de sêmen de 0,5 mL contendo 500 milhões de espermatozoides, que foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente descongeladas em banho-maria a 50 °C durante oito segundos e diluídas em 10 mL de diluidor BTS a 37 °C. Em seguida, foram acrescentadas as mesmas concentrações de IGF-I e analisaram-se os parâmetros seminais. A adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado não alterou o vigor espermático, os parâmetros morfológicos e o consumo de frutose, no entanto, melhorou a motilidade, o teste de vivos e mortos, a resistência osmótica, a peroxidação lipídica e a atividade da glutatona peroxidase. Desta forma, concluiu-se que a adição de 150 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno descongelado proporciona melhoria nos parâmetros seminais.

Palavras-chave: Espermatozoides. Varrão. Hormônio. Reprodução.

## ABSTRACT

This study aimed to analyze the concentration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in seminal plasma and correlate it with fresh semen parameters and evaluate the effects of the addition of IGF-I in cooled and frozen semen on the seminal parameters. Three experiments were conducted at farm São Paulo (Oliveira - MG) between January and May from 2010. To evaluate the correlation between the concentration of IGF-I in seminal plasma and *in natura* seminal parameters, were collected two ejaculates from 27 boars by the gloved hand method. It was found that boars have averaged 1.5 ng/mL of IGF-I in seminal plasma and that there is a negative correlation with the test of living and dead of fresh semen. To evaluate the addition of IGF-I in cooled semen, seven ejaculates were collected from seven animals, which were made insemination doses of 100 mL containing three billion spermatozoa that were cooled at 15 °C. After 24, 48 and 72 hours of storage, were added different concentrations of IGF-I (0, 50, 100 and 150 ng/mL) in aliquots of 10 mL of semen incubated at 37 °C in a water bath. Were evaluated the sperm motility and the vigor at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes of incubation, and test of living and dead, osmotic resistance, morphology, lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and fructose uptake at 0 and 120 minutes of incubation. The addition of IGF-I in boar semen cooled did not alter the motility, vigor and morphological parameters, however improved the test of living and dead, osmotic resistance, lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and decreased the fructose uptake. It was concluded that the addition of 100 ng/mL of IGF-I in boar semen cooled provides improvement in seminal parameters. For the evaluation of the addition of IGF-I in the thawed semen, seven ejaculates from seven animals were processed in 0.5 mL semen straws containing 500 million spermatozoa that were frozen in liquid nitrogen and later thawed in a water bath at 50 °C for eight seconds and diluted in 10 ml of BTS extender at 37 °C, then were added the same concentrations of IGF-I and analyzed the semen parameters. The addition of IGF-I in boar semen thawed did not alter the vigor, morphological parameters and fructose uptake, however, improved the motility, test of living and dead, osmotic resistance, lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity. Thus, it was concluded that the addition of 150 ng/mL of IGF-I in boar semen thawed provides improvement in semen parameters.

Keywords: Sperm. Boar. Hormone. Reproduction.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 10 |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 12 |
| <b>2.1 Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)</b> .....  | 12 |
| <b>2.2 Resfriamento de sêmen suíno</b> .....   | 13 |
| <b>2.3 Congelamento de sêmen suíno</b> .....   | 16 |
| <b>2.4 Inseminação artificial e índices reprodutivos</b> .....   | 19 |
| <b>2.5 Influência do IGF-I nos espermatozoides</b> .....   | 20 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 23 |
| <b>3.1 Os animais e o manejo</b> .....   | 23 |
| <b>3.2 A colheita e a avaliação do sêmen</b> .....   | 23 |
| <b>3.3 Experimento I: Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e a sua influência nos parâmetros seminais <i>in natura</i></b> ..... | 24 |
| <b>3.4 Experimento II: Adição de IGF-I ao sêmen suíno resfriado</b> .....  | 27 |
| <b>3.5 Experimento III: Adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado</b> ..   | 30 |
| <b>3.6 Análises estatísticas</b> .....   | 34 |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....   | 36 |
| <b>4.1 Experimento I: Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e a sua influência nos parâmetros seminais <i>in natura</i></b> ..... | 36 |
| <b>4.2 Experimento II: Adição de IGF-I ao sêmen suíno resfriado</b> .....  | 38 |
| <b>4.3 Experimento III: Adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado</b> ..   | 53 |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....  | 60 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 61 |
| <b>ANEXOS</b> .....  | 74 |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a suinocultura é a maior atividade pecuária praticada no mundo, representando 100,8 milhões de toneladas do mercado mundial de carnes, de um total de 277,8 milhões de toneladas, segundo a Food and Agriculture Organization, FAO (2009).

O crescente aumento da produção de carne suína nos últimos anos, acompanhado do aumento do consumo pela população, deveu-se ao significativo avanço nas áreas de genética, sanidade, nutrição, reprodução e manejo na suinocultura. Neste contexto, a suinocultura brasileira é uma das que mais tem se destacado, crescendo em qualidade e volume de produção, utilizando novas tecnologias e obtendo melhores índices zootécnicos. Essa mudança estrutural no setor tem demandado animais com elevada eficiência reprodutiva, estando associados também à excelente qualidade de carne de seus descendentes.

A inseminação artificial (IA) é uma técnica que permite utilizar sêmen de animais de alta qualidade com melhor eficiência, abrangendo maior número de fêmeas por ejaculado. Entretanto, esta prática ainda apresenta limitações, tais como o reduzido tempo de armazenamento e o elevado número de espermatozoides na dose inseminante necessário para assegurar taxas de fertilidade satisfatórias no rebanho.

Com o intuito de melhorar a taxa de fertilização do sêmen destinado a IA, diversos estudos têm sido conduzidos. Além de inúmeras tentativas no aprimoramento de técnicas de manipulação do sêmen em laboratório e protocolos de inseminação, o conhecimento do papel dos hormônios reguladores do metabolismo de nutrientes na função reprodutiva dos gametas tem recebido especial atenção nos últimos anos. Dentre eles, o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), tem sido extensivamente estudado em fêmeas, porém poucos estudos têm sido conduzidos com machos reprodutores. Sabe-se

que este hormônio desempenha importante papel no controle da função testicular, estando envolvido no desenvolvimento das células germinativas, na maturação e na ativação da motilidade espermática durante a ejaculação. Além disso, tem sido verificada uma associação entre a produção de IGF-I pelas células do oviduto e a taxa de fecundação. Desta forma, acredita-se que as concentrações deste hormônio possam estar relacionadas com as taxas de fertilização do rebanho.

Alguns trabalhos com bovinos, equinos e bubalinos foram conduzidos na tentativa de elucidar o papel do IGF-I na capacidade fecundante dos espermatozoides, porém nenhum estudo relacionando a função deste hormônio com a fisiologia reprodutiva de suínos machos tem sido relatado.

As expectativas oriundas das pesquisas já realizadas e também daquelas ainda em andamento, apontam para a ampliação no uso da IA com sêmen resfriado ou congelado, contribuindo para aumentar a competitividade e a rentabilidade da cadeia produtiva da suinocultura. Por meio do resfriamento das doses inseminantes, é possível otimizar a mão-de-obra nos laboratórios de IA e também, a eficiência dos varrões. Além disso, o congelamento do sêmen suíno proporciona vantagens como armazenamento por tempo indeterminado, preservação de raças e linhagens, diminuição da quantidade de espermatozoides e do volume das doses inseminantes e ainda facilita o transporte de material genético entre granjas suinícolas.

Com a junção das técnicas de armazenamento e de adição de hormônios ao sêmen suíno, aumenta-se a possibilidade de maiores avanços na reprodução desses animais e, conseqüentemente, na produção de carne suína como um todo.

Sendo assim, este trabalho foi conduzido com os objetivos de analisar a concentração de IGF-I no plasma seminal de suínos e correlacioná-la com os parâmetros seminais *in natura* e avaliar os efeitos da adição de IGF-I ao sêmen resfriado e congelado sobre os parâmetros de qualidade seminal.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)**

IGF-I é um polipeptídeo formado por 70 aminoácidos, com peso molecular de 7,47 kDa, cuja sequência de aminoácidos é bem parecida com a da pró-insulina e exerce efeitos semelhantes aos da insulina sobre o crescimento (ROSENDAL et al., 2002). Esse hormônio recebeu a denominação IGF-I devido ao termo inglês insulin-like growth factor-I, no entanto, também é conhecido por somatomedina C.

De acordo com Bartke (2000), o IGF-I é produzido principalmente no fígado, mas também é expresso em quase todos os demais tecidos, incluindo o muscular (KAMANGA-SOLLO et al., 2004).

Esse fator é secretado pelo fígado em resposta à estimulação do hormônio do crescimento (GH), sendo o mais potente estimulador da síntese protéica (BAUER; LACORN; CLAUS, 2009). Sabe-se ainda que o IGF-I também tem sido observado no eixo reprodutivo e tem apresentado importante papel na reprodução (ZULU; NAKAO; SAWAMUKAI, 2002).

Sferruzzi-Perri et al. (2006) relataram que a administração de IGF-I à fêmea suína reduz a adiposidade materna no final da gestação, sugerindo repartição de nutrientes para os conceptos com a finalidade de promover o crescimento fetal. Além disso, a suplementação de IGF-I aumenta a concentração de aminoácidos circulantes no feto e a circulação de hormônio esteroide na mãe, o que pode modificar as respostas fisiológicas para a gestação e a partição de nutrientes.

Em estudos de Sferruzzi-Perri et al. (2007), foi verificado que a infusão de IGF-I em fêmeas suínas gestantes aumentou a captação placentária de

aminoácidos e glicose, assim como também aumentou as transferências desses nutrientes para os fetos.

Sabe-se também que este hormônio desempenha importante papel na maturação e fertilização ovocitária, no desenvolvimento precoce do embrião bem como na sua implantação, no crescimento e desenvolvimento do feto e da placenta além de influenciar no tamanho da leitegada (ZACZEK et al., 2002).

A relação entre a concentração de IGF-I e o tamanho placentário consiste após a verificação do número de leitões viáveis, porém o fundo fisiológico dessa relação não é bem claro (BRAND et al., 2001).

No trato reprodutivo masculino, o IGF-I tem sido identificado nos testículos (HESS; ROSER, 2001), onde é secretado pelas células de Leydig e Sertoli (ROSER, 2001). Além disso, receptores de IGF-I têm sido identificados em espermatozoides (NAZ; PADMAN, 1999).

## **2.2 Resfriamento de sêmen suíno**

Durante décadas, atenção considerável foi direcionada ao desenvolvimento de tecnologias reprodutivas em suinocultura. A IA é um exemplo desta biotécnica, a qual continua a ser expandida nos atuais sistemas de produção.

A utilização do sêmen do reprodutor suíno em programas de IA triplicou nos últimos anos e, em muitos países da Europa, mais de 90% das fêmeas são inseminadas e, na América do Norte, cerca de 70% (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

Na indústria suinícola atual, a maioria das inseminações artificiais em todo o mundo ocorre com sêmen diluído, podendo ser usado no mesmo dia ou estocado a 15-20 °C por 1-5 dias antes da inseminação (JOHNSON; WEITZE; MAXWELL, 2000). Segundo Cerolini et al. (2001), refrigerar entre 16 e 18 °C é

o método habitual de armazenar sêmen suíno por alguns dias e boas taxas de fertilidade são obtidas em comparação com as amostras frescas.

A compreensão e aceitação dos procedimentos para a preparação e avaliação das doses inseminantes, juntamente com uma grande disponibilização de equipamentos por parte das indústrias associadas ao agronegócio da IA contribuiu para a melhora significativa na qualidade das doses e para uma maior utilização desta tecnologia.

Análise de diversas características do ejaculado suíno ajudam a melhor discriminar o potencial de fertilidade porque combinam informações de diversos atributos espermáticos (GADEA; SÉLLES; MARCO, 2004; QUINTERO-MORENO; RIGAU; RODRIGUEZ-GIL, 2004). Na Tabela 1, pode-se observar os valores padrões para o sêmen suíno *in natura* ser considerado bom para a produção de doses inseminantes.

Ultimamente, linhas de pesquisa com diluidores têm sido desenvolvidas, objetivando o prolongamento do tempo de estoque de três para cinco ou sete dias (ALVARENGA; MURGAS; ZANGERONIMO, 2009; MURGAS et al., 2002), além de objetivar a melhoria das características espermáticas.

Huo et al. (2002) mostraram que a viabilidade e a atividade mitocondrial dos espermatozoides nos meios de longa duração são superiores a 50%, até o 13º dia de conservação. No entanto, a maioria dos diluidores permite o armazenamento do sêmen por, no máximo, 72 horas após a preparação das doses.

Entre o primeiro e o terceiro dia de armazenamento, a motilidade e a integridade acrossômica dos espermatozoides geralmente permanecem altas, mas vários estudos com IA indicam que os espermatozoides sofrem danos funcionais decorrentes das condições de armazenamento (JOHNSON; WEITZE; MAXWELL, 2000).

Para o sucesso da conservação do sêmen suíno, dois fatores são importantes: a temperatura de armazenamento e a composição do meio diluidor (JOHNSON; WEITZE; MAXWELL, 2000). De acordo com Mateos (2003), os elementos necessários à sobrevivência dos espermatozoides suínos ainda não são totalmente conhecidos, mas é sabido que, para conservar as células espermáticas por períodos prolongados, é necessário que se reduza a atividade metabólica dos espermatozoides, mediante a diluição em temperatura e em meio adequados. Outros fatores, não menos relevantes, também devem ser levados em consideração, como por exemplo, a estrutura do laboratório e a tecnificação dos funcionários.

No entanto, o êxito da IA não está relacionado somente à capacidade do diluente em conservar os espermatozoides em condições adequadas durante este tempo de estocagem do sêmen, mas também na manutenção da capacidade fecundante do mesmo após sua utilização. Assim, os diluidores de sêmen suíno devem garantir para os espermatozoides fonte de energia, pH adequado e pressão osmótica ideal, além também de prevenir o crescimento bacteriano.

Anil et al. (2004) afirmaram que o sêmen armazenado em um diluente formulado para dez dias de uso diminuiu a fertilidade em porcas quando se utilizou a dose armazenada durante seis dias, mas isso não aconteceu em marrãs.

De acordo com Bortolozzo et al. (2005), a garantia de qualidade dos diluentes atualmente comercializados, reconhecidos pelo Ministério da Agricultura, e a disponibilidade de produtos destinados a diferentes períodos de armazenamento também contribuem para a maior qualidade e potencial fecundante da dose inseminante (qualidade e viabilidade dos espermatozoides).

Diante do exposto, pode-se afirmar que o desenvolvimento de uma técnica que permita a longa conservação do poder fecundante do sêmen provavelmente facilita sua utilização em programas de IA, proporcionando otimização dos reprodutores.

Tabela 1 Valores padrões para o sêmen suíno *in natura* ser considerado bom para a produção de doses inseminantes

| Parâmetro Seminal                        | Padrão               | Referência                                 |
|--|----------------------|--|
| Aparência do ejaculado                   | Branco a acinzentado | Bortolozzo et al. (2005)                   |
| Peso do ejaculado (g)                    | 150 a 250            | Lima, Oliveira e Fialho (2004).            |
| Motilidade espermática (%)               | No mínimo 70         | Lima et al. (2007)                         |
| Vigor espermático                        | No mínimo 3          | Lima et al. (2007)                         |
| Grau de aglutinação (aglutinações/campo) | No máximo 3          | Flowers (1996)                             |
| Taxa de degradação da motilidade (%)     | No máximo 40         | Tonio (1988 citado por UCHOA et al., 2002) |
| Acrossomas anormais (%)                  | No máximo 5          | Scheid (1993)                              |
| Caudas anormais (%)                      | No máximo 10         | Scheid (1993)                              |
| Gota citoplasmática proximal (%)         | No máximo 10         | Corrêa et al. (2001)                       |
| Total de anormalidades (%)               | No máximo 20         | Lima et al. (2007)                         |

### 2.3 Congelamento de sêmen suíno

A técnica de congelamento de sêmen suíno não é nova; no entanto, esta não se desenvolveu conforme o esperado, pelo menos até o momento. Apesar disso, pesquisas continuam abordando este tema, pois o domínio do congelamento de sêmen suíno traria vantagens como a importação e exportação de doses de alta qualidade genética ao redor do mundo com menor dificuldade, a perpetuação de espécies nativas (PALLAS; DE ALBAS, 2002) e a garantia de fornecimento constante de sêmen no caso de um problema epidemiológico temporário ou se a produção de sêmen diminuir como resultado de efeitos climáticos adversos (CEROLINI et al., 2001).

Devido à redução do desempenho reprodutivo e às dificuldades no processo, o uso de sêmen congelado fica restrito apenas à comercialização de

doses por longas distâncias e ao campo experimental (BORTOLOZZO et al., 2005).

As inseminações artificiais poderão ser realizadas exclusivamente com sêmen suíno congelado no futuro apenas se forem resolvidos os aspectos negativos que estão associados à sua utilização, tais como: baixo desempenho reprodutivo, alta variabilidade entre os animais em resposta ao congelamento e alta concentração de espermatozoides nas doses inseminantes (MARTÍN, 2000).

Existem diversos protocolos desenvolvidos que objetivam a melhoria da técnica de congelamento de sêmen suíno. Poto et al. (2000) verificaram melhor qualidade no sêmen quando descongelado a 56 °C durante oito segundos do que a 42 °C por 45 segundos, sendo assim, varrões considerados inaptos após o congelamento/descongelamento do sêmen podem tornar-se úteis quando o sêmen é bem processado.

Córdova, Pérez e Martín (2000) confirmaram que a temperatura utilizada no processo de descongelamento de sêmen suíno é crucial para a viabilidade e capacidade de fertilização *in vitro* (FIV). Os resultados de suas pesquisas indicaram que os espermatozoides suínos descongelados não perdem a capacidade de fertilização *in vitro*, quando comparado com o sêmen fresco. Porém, esses autores afirmaram que o processo de congelamento e descongelamento reduz a motilidade espermática e a integridade acrossômica pela metade.

Echegaray (2003) afirmou que, para o congelamento de sêmen suíno, é necessário fazer uma seleção preliminar dos animais a serem utilizados e que somente 20 a 30% dos reprodutores podem ser utilizados como doadores de sêmen para o congelamento, considerando um mínimo de 35% de motilidade espermática das doses descongeladas.

Em experimentos de Cerolini et al. (2001), foi observado que a alta habilidade espermática antes do congelamento é indicativa de boa viabilidade e

motilidade após o congelamento/descongelamento e que a qualidade do espermatozoide também interfere nas alterações que ocorrem no conteúdo de lipídeo da célula espermática após o processo de criopreservação.

A particular sensibilidade ao frio dos espermatozoides suínos é um problema em se tratando de criopreservação. No entanto, a fração rica em espermatozoides é mais resistente do que o ejaculado completo e pode tolerar o resfriamento lento (CÓRDOVA; PÉREZ; MARTÍN, 2000).

O problema do congelamento de sêmen suíno não é a sua manutenção a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas a grande porcentagem de células espermáticas que morrem na faixa de temperatura entre  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo que cada célula passa duas vezes por essa temperatura no processo de congelamento e descongelamento (ECHEGARAY, 2003).

Os efeitos do congelamento sobre as características fisiológicas têm sido observados, tais como queda da motilidade espermática, dano acrossomal e diminuição da capacidade fecundante (CURRY, 2000). De acordo com Petrunkina et al. (2001), a estocagem *in vitro* acarreta em deficiências na qualidade dos espermatozoides, o que reduz a capacidade de movimentação através do oviduto.

Roa et al. (2005) afirmaram que a inseminação artificial intra uterina (IAIU) parece ser o complemento apropriado para o emprego do sêmen congelado, visto que através dessa biotecnologia o sêmen é depositado diretamente no útero da matriz, reduzindo assim, a necessidade de muitos espermatozoides com alta viabilidade.

Segundo Córdoba, Pérez e Martín (2004), a influência do choque térmico durante o congelamento na redução da resposta do espermatozoide frente à FIV ainda não é clara, mas os resultados obtidos com a FIV monospérmica têm sido encorajadores para o uso de sêmen congelado na IA de suínos.

Como já mencionado, a técnica de congelamento de sêmen suíno ainda precisa ultrapassar muitas dificuldades e a adição de produtos que possam melhorar os parâmetros seminais pode ser uma boa alternativa.

#### **2.4 Inseminação artificial e índices reprodutivos**

A inseminação artificial é a técnica reprodutiva mais utilizada nas grandes granjas comerciais de suínos, tanto no Brasil, como no mundo. A grande difusão da IA deveu-se principalmente ao surgimento de linhagens genéticas de machos terminais que agregaram às carcaças de seus descendentes as qualidades exigidas pela tipificação instituída na indústria de carnes (BORTOLOZZO et al., 2005).

De acordo com Roca et al. (2006), a IA tem alcançado ótimos índices reprodutivos, como alta taxa de parto e tamanho de leitegada, os quais são melhores ou iguais aos índices obtidos com a monta natural. Flowers e Alhusen, (1992) também verificaram aumento da taxa de parição com o uso da IA. Além disso, Biedermann e Rupp (1995) afirmaram que a IA foi superior ao acasalamento natural no que diz respeito a várias características reprodutivas.

Além dos bons índices reprodutivos, inúmeras vantagens levaram à ampla difusão da IA, dentre as quais estão os ganhos genéticos com a utilização de machos geneticamente superiores, redução nos custos de cobertura, melhor aproveitamento das instalações, maior segurança sanitária, maiores cuidados higiênicos nas coberturas, eliminação dos ejaculados impróprios para uso e evolução técnica da equipe na implantação dessa tecnologia (WENTZ et al., 2000).

Quanto aos tipos de IA, Fitzgerald, Jones e Stalder (2008) afirmaram que não existe diferença na performance reprodutiva (taxa de parto, número total de leitões nascidos, número de leitões nascidos vivos e tamanho da leitegada)

entre a inseminação artificial intracervical (IAIC) e a inseminação artificial intra-cervical (IAIU) e que a decisão de qual tipo de inseminação utilizar deve depender da estimativa dos custos. Miller et al. (2009) afirmaram que utilizando 500 milhões de espermatozoides em um volume de 20 mL de sêmen na IAIU obtém-se 100% de taxa de parição e Alvarenga, Murgas e Zangeronimo (2009) verificaram que a IAIU com volume de 15 mL e concentração de 1,5 bilhão de espermatozoides proporciona índices reprodutivos satisfatórios. Bolarin et al. (2006) verificaram que não existem diferenças estatísticas nos índices reprodutivos de matrizes suínas inseminadas com IAIC ou com IAIU profunda, indicando que a IAIU profunda não tem efeito negativo sobre o potencial de fertilidade.

Como a IA tem apresentado diversos benefícios para a reprodução de suínos, é fundamental que se continuem as pesquisas voltadas para a melhoria dessa biotecnologia, bem como para a melhoria dos parâmetros do sêmen destinado a IA, pois, com o aumento dos índices reprodutivos, pode-se aumentar tanto a quantidade quanto a qualidade da carne suína produzida.

## **2.5 Influência do IGF-I nos espermatozoides**

A influência do IGF-I sobre a função reprodutiva em fêmeas é bem conhecida (STEVENSON; WATHES, 1996; WATHES et al., 1998), entretanto, poucos estudos tem sido conduzidos para mostrar um possível papel deste hormônio na função reprodutiva em machos (GANCARCZYK et al., 2006; HENRICKS et al., 1998).

Sabe-se que receptores para IGF-I podem ser encontrados em espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides (HENRICKS et al., 1998). Sendo assim, o IGF-I pode ser um importante fator envolvido não só no desenvolvimento, mas também na maturação e na ativação da motilidade

espermática (VICKERS et al., 1999).

No sêmen de equinos sexualmente ativos, existem cerca de 10,3 ng/mL de IGF-I (MACPHERSON et al., 2002) e em bovinos, há aproximadamente 130,0 ng/mL, variando bastante entre raça e idade dos animais (HENRICKS et al., 1998). Nesses trabalhos, verificou-se que existe influência do IGF-I na qualidade dos espermatozoides, principalmente quanto à motilidade, vigor e morfologia espermática. No entanto, a importância do IGF-I na reprodução, está mais associada ao processo de maturação de espermatozoides no trato reprodutivo feminino do que no masculino. Foram verificados eventos envolvendo a maturação e a capacitação dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino, mais especificamente no oviduto (SMITH, 1998; SUAREZ, 1998).

Henricks et al. (1998) afirmaram que o IGF-I presente no plasma seminal bovino pode interagir com uma determinada região acrossomal do espermatozoide (receptores para IGF-I). Essa interação entre hormônio e receptor pode aumentar a motilidade e o vigor espermático. A presença de IGF-I no trato reprodutivo masculino e feminino, bem como de receptores em células espermáticas sugere um possível papel regulatório em eventos de pré-fertilização.

Segundo Quetglas et al. (2001), a adição de IGF-I na maturação *in vitro* ou cultura de embrião não teve efeito benéfico no desenvolvimento de embriões bovinos.

Em alguns estudos com roedores, também é possível observar a relação entre IGF-I e a fisiologia da reprodução de machos, como por exemplo, o estudo de Vickers et al. (1999), em que o IGF-I melhorou a motilidade espermática e diminuiu a quantidade de alterações morfológicas de espermatozoides imaturos de ratos deficientes em GH.

Em humanos, após a incubação do sêmen com 50 ng/mL de IGF-I, Miao

et al. (1998) averiguaram que esse hormônio exerce efeito direto na motilidade e na ativação espermática, o que precede o evento da fertilização. Assim, as concentrações seminais de IGF-I podem estar relacionadas à capacidade fecundante dos espermatozoides devido ao envolvimento com a continuidade da motilidade após a ejaculação (MACPHERSON et al., 2002). Desta forma, supõe-se que animais com maiores concentrações de IGF-I no sêmen possam ter espermatozoides mais resistentes ao processo de diluição. Esta hipótese surgiu a partir dos estudos conduzidos por Henricks et al. (1998) com bovinos. Neste trabalho, os autores verificaram que a adição *in vitro* de IGF-I em concentrações fisiológicas estimulou a motilidade espermática em amostras de sêmen e sugeriram que este hormônio poderia manter esta taxa devido à facilitação do uso da energia (aceleração do metabolismo) ou ao seu efeito antioxidante, atuando como protetor de membrana.

Recentemente, Selvaraju et al. (2009) estudaram o efeito da adição de 100 ng/mL de IGF-I no sêmen descongelado de búfalos sobre a motilidade, integridade da membrana e do acrossoma, integridade funcional, peroxidação lipídica e utilização de frutose por espermatozoides. Entretanto, trabalhos semelhantes não foram encontrados na literatura procurando elucidar o papel do IGF-I na função espermática de suínos.

Neste sentido, a adição de IGF-I ao sêmen suíno resfriado ou congelado pode ser uma alternativa para diminuir os danos fisiológicos dos espermatozoides bem como para melhor aproveitar os nutrientes do meio diluidor e assegurar a fertilização.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização dos experimentos e caracterização dos animais**

Os experimentos foram realizados na granja comercial de suínos (ciclo completo) da Fazenda São Paulo localizada em Oliveira – MG nos meses de janeiro, abril e maio de 2010.

Antes do início dos experimentos, os varrões foram avaliados clinicamente (exame andrológico) e tiveram sua fertilidade comprovada. Durante a pesquisa, os animais receberam 2,5 kg de ração por dia, distribuídos em dois arraçoamentos e a água foi fornecida à vontade.

Os reprodutores foram mantidos em baias individuais situadas em galpão de alvenaria, sendo a umidade e a temperatura controladas. As temperaturas mínimas e máximas em °C no interior do galpão foram respectivamente  $20,5 \pm 2,9$  e  $29,2 \pm 2,9$  para o mês de janeiro,  $17,5 \pm 3,1$  e  $27,0 \pm 2,6$  para abril e  $17,3 \pm 3,2$  e  $25,6 \pm 2,0$  para maio.

#### **3.2 Colheita e avaliação do sêmen**

A colheita do sêmen foi realizada com auxílio de um manequim fixo macio para que o animal se sentisse confortável durante a monta e adequado para não produzir traumatismos no pênis ou aparelho locomotor dos cachãos. As colheitas foram realizadas sempre pela manhã, uma hora após o arraçoamento.

A colheita do sêmen foi realizada em sala específica pelo método da mão enluvada, em frasco/recipiente graduado (mL) com capacidade para 500 mL, pré-aquecido a 37 °C e protegido por recipiente isotérmico (copo térmico). Antes da colheita, foi realizada a higienização do prepúcio através de pressão

manual no sentido da abertura prepucial e limpeza da região com papel toalha. Durante a colheita, foi realizada a separação da fração gelatinosa do ejaculado, por meio de camada dupla de papel filtro adaptada ao frasco coletor. Coletou-se o ejaculado na sua totalidade (fração pobre e rica em espermatozoides).

Após a colheita, o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório da própria granja, sendo mantido a 37 °C em banho-maria para que fossem realizadas as avaliações rotineiras do sêmen *in natura* para possível descarte de material anormal. Foram feitas avaliações tanto macroscópicas como microscópicas do ejaculado. Todo material utilizado na avaliação seminal e que entrou em contato com o sêmen foi mantido a 37 °C.

### **3.3 Experimento I: Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e a sua influência nos parâmetros seminais *in natura***

Foram utilizados 27 varrões entre sete e 34 meses de idade, sendo 18 da genética Agroceres, cinco D-Best, três LM e um Genetic Pork. Ao todo, foram coletados dois ejaculados de cada animal.

Após a colheita do sêmen, foram avaliados os seguintes parâmetros *in natura*:

a) Aparência: determinada visualmente, sendo atribuído o valor 1 para aparência aquosa, 2 para soro-leitosa (mais comum) e 3 para leitosa.

b) Odor: o sêmen suíno possui odor característico ou *sui generis*. Foi avaliada a presença de urina, cheiro fétido e odor normal. A presença de odor fétido ou de urina indicou contaminação do ejaculado sendo o mesmo descartado.

c) Volume/Peso: determinado diretamente pela leitura no recipiente em mL e pesando-se o ejaculado *in natura* (subtraindo-se o peso do recipiente de colheita) em balança digital de precisão, considerando 1,0 g igual a 1,0 mL.

d) Motilidade espermática: uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula e em microscópio óptico com aumento de 100x, verificou-se o percentual de células espermáticas móveis;

e) Vigor espermático: uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula e foi observada em microscópio óptico com aumento de 100x, onde a força de movimento do espermatozoide foi classificada entre zero e cinco;

f) Grau de aglutinação: uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula e foi observada a quantidade de aglutinações por campo em microscópio óptico com aumento de 100x. Foram atribuídos valores de zero a três pontos, sendo os valores mais elevados indicativos de sêmen mais aglutinado.

g) Teste de vivos e mortos: uma gota de sêmen foi corada com uma gota de eosina-nigrosina e um esfregaço em lâmina foi realizado e observado em microscópio óptico com aumento de 400x, onde se verificou o percentual de células espermáticas vivas (sem coloração) e mortas (róseas), segundo metodologia de Mies Filho (1982);

h) Concentração espermática: uma gota de sêmen foi colocada em microcurveta e a concentração (espermatozoides/mL ou spz/mL) foi verificada através de espectrofotômetro;

i) Taxa de degradação da motilidade (TDM): foi realizada a incubação de 2,0 mL de sêmen a 37 °C por um período de duas horas e após isso foi aplicada a seguinte fórmula matemática, para que fosse calculada a taxa de degradação da motilidade (SALGUEIRO et al., 2003):

$$\text{TDM (\%)} = \frac{\text{vigor (a 5 minutos)} - \text{vigor (a 2 horas)} \times 100}{\text{vigor (a 5 minutos)}}$$

j) Teste de resistência osmótica (TRO): foram adicionados 100µl de sêmen puro em 1,0 mL de solução 100 mOs/L de água (duas partes de água destilada: uma parte de diluente BTS – *Beltsville Thawing Solution*) e o material

foi incubado por 40 minutos a 37 °C. Em seguida, foi avaliada a proporção de espermatozoides com a cauda enrolada e com a cauda reta, utilizando um microscópio óptico com aumento de 400x, em um total de 100 espermatozoides contados. Espermatozoides com a cauda reta indicaram ruptura de membrana, já os que permaneceram com a membrana íntegra apresentaram a cauda enrolada.

k) Morfologia espermática: pequena quantidade de sêmen foi misturada a uma solução de formol-citrato (2,94%). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA para posterior análise. Uma gota da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio de contraste de fases com aumento de 1000x, utilizando óleo de imersão. Foram contados 100 espermatozoides e contabilizadas a quantidade de anormalidades no acrossoma, na cauda (enrolada, quebrada, enovelada e isolada), quantidade de gota citoplasmática proximal (GCP) e a quantidade total de anormalidades morfológicas na amostra (alterações de cabeça – pequena, grande, piriforme e isolada, alterações de acrossoma e de parte intermediária, alterações na cauda e presença de GCP).

l) Concentração de IGF-I ([IGF-I]): imediatamente após a avaliação inicial, 1,0 mL de sêmen foi colocado em tubo de eppendorf e centrifugado (3 °C, 3360 g durante dez minutos) para remover o sobrenadante contendo o plasma seminal. Novamente, a amostra retirada foi centrifugada nas mesmas condições para remoção de todos os espermatozoides. O sobrenadante resultante foi então armazenado a -10 °C até a determinação da concentração de IGF-I que foi estimada utilizando kit de ELISA (imunoensaio), seguindo o protocolo do produto. O kit usado teve o IGF-I humano recombinante como padrão (*Human IGF-I ELISA Kit 1x96well - RAYBIOTECH – USA*). Esta técnica foi escolhida frente à similaridade entre o IGF-I humano e suíno, pois, de acordo com Tavakkol, Simmen e Simmen (1988), a sequência de aminoácidos é altamente

conservada entre as espécies, mostrando 100% de homologia entre o IGF-I humano, suíno e ovino. Outro motivo para a escolha desta técnica foi a alta sensibilidade do teste, segundo Roberts e Almond (2003). O método de análise ELISA para verificar a concentração de IGF-I nas amostras de plasma seminal também foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal da UFLA.

### **3.4 Experimento II: Adição de IGF-I ao sêmen suíno resfriado**

Foram utilizados sete varrões da genética Agroceres PIC, linhagem 337 TG Superior, com idade entre um e dois anos.

Foi coletado um ejaculado de cada animal. Após a colheita e a avaliação rotineira do sêmen *in natura* (aparência, volume, motilidade, vigor e grau de aglutinação), o material foi diluído em solução 1:1 com o diluente BTS. Em seguida, determinou-se a concentração espermática em espectrofotômetro para o cálculo das doses inseminantes (três doses de 100 mL contendo três bilhões de espermatozoides). Novamente, o BTS foi utilizado para a diluição do sêmen, sendo o primeiro adicionado sobre o segundo.

Após o sêmen ser diluído e devidamente fracionado em frascos de armazenamento, as doses de sêmen foram mantidas à temperatura ambiente em local protegido contra luz durante 90 minutos. Em seguida, as doses foram refrigeradas a 15 °C.

Às 24 horas de armazenamento, quatro alíquotas de 10 mL foram retiradas de um dos frascos armazenados, novamente aquecidas a 37 °C em banho-maria e então adicionadas quantidades de IGF-I humano recombinante (Human IGF-I 100 µg – BIOVISION - USA): 0; 50, 100 e 150 ng/mL. A solução resfriada que sobrou no interior do frasco foi descartada.

Após a adição do hormônio, em cada alíquota reaquecida, foram

avaliados a motilidade e o vigor espermático nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação em banho-maria a 37 °C. Nos tempos 0 e 120 minutos de incubação, também foram realizados os testes de vivos e mortos, resistência osmótica e amostras foram coletadas para posterior realização da análise de morfologia espermática. Todas essas análises foram realizadas como descrito anteriormente no experimento I.

Além dessas análises, nos tempos 0 e 120 minutos de incubação, coletou-se em tubos de eppendorf, amostras de 1,0 mL para realização de análises de peroxidação lipídica e consumo de frutose pelos espermatozoides e amostras de 100 µL para análise de atividade da glutathione peroxidase. Esses tubos de eppendorf foram centrifugados a 3360 g durante dez minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de eppendorf devidamente identificados e foi congelado a -10 °C até o dia das análises, as quais foram realizadas de acordo com a seguinte metodologia:

a) Peroxidação lipídica: foi utilizado um kit específico para essa análise (QuantiChrom™ TBARS Assay Kit – BioAssay Systems) seguindo a metodologia especificada pelo fabricante. O preparo das amostras e dos reagentes foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal da UFLA e as amostras foram lidas em leitor de ELISA no Laboratório de Fitopatologia também da UFLA. O princípio do kit era mensurar a quantidade de malondialdeído (MDA) produzido com a reação, pois este é o principal produto da peroxidação lipídica. A concentração de MDA foi expressa em µmol equivalente.

b) Atividade da glutathione peroxidase (AGP): foi utilizado um kit específico para essa análise (*Glutathione Peroxidase Activity Kit* – Assay Designs) seguindo a metodologia do mesmo. A análise foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da UFLA e a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA a 340 nm a cada 30 segundos durante um período de 15 minutos. A

atividade da glutathione peroxidase foi expressa em nmole/min/mL ou em unidades/mL, sendo que uma unidade de glutathione peroxidase é definida como a quantidade de enzima que oxidou um nmol de NADPH em NADP<sup>+</sup> por minuto a 25 °C.

c) Consumo de frutose: as amostras de plasma seminal foram descongeladas e desproteinizadas antes do início da análise. Para retirar as proteínas do plasma seminal, 0,1 mL da amostra foi colocado em tubo de ensaio e foram acrescentados 2,9 mL de água destilada, 0,5 mL de Ba(OH)<sub>2</sub> (0,15 mol/L) e 0,5 mL de ZnSO<sub>4</sub> (0,175 mol/L). A solução foi misturada e mantida em repouso durante cinco minutos. Em seguida, filtrou-se utilizando papel filtro. Do material filtrado, 1,0 mL foi transferido para um novo tubo de ensaio, onde se adicionou 1,0 mL de solução de resorcinol (8,47 mmol/L) e 3,0 mL de HCl (10 mol/L). Utilizou-se solução de D-frutose (0,28 mmol/L) como padrão e água destilada como branco. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 90°C durante dez minutos e, após atingir a temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 490 nm em espectrofotômetro. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Ciências dos Alimentos da UFLA. Após diminuir o valor de absorvância do branco, a concentração de frutose no plasma seminal foi expressa em mmol/L de acordo com a fórmula: valor de absorvância da amostra/valor de absorvância do padrão x 11,12. Para conhecer a taxa de consumo de frutose pelos espermatozoides, utilizou-se a seguinte equação: concentração de frutose a 0 minuto de incubação – concentração de frutose a 120 minutos de incubação. Toda a metodologia foi adaptada do trabalho de Lu et al. (2007).

Às 48 e 72 horas de armazenamento, todo o procedimento de incubação do sêmen, realização de análises e coleta de amostras para posteriores testes foram realizados de acordo com a mesma metodologia descrita para 24 horas de armazenamento.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com

sete repetições (animais) em esquema fatorial 4x3 (quatro doses de IGF-I e três tempos de armazenamento) com parcelas subdivididas no tempo (períodos de avaliação após o reaquecimento). Apenas para a variável consumo de frutose, as parcelas não foram subdivididas no tempo.

### **3.5 Experimento III: Adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado**

Foram utilizados sete varrões da genética Agroceres PIC, linhagem 337 TG Superior, com idade entre um e dois anos.

A metodologia proposta para o congelamento e o descongelamento do sêmen suíno foi modificada do trabalho de Westendorf et al. (1975).

Foi coletado um ejaculado de cada animal. Após a colheita e a avaliação rotineira do sêmen *in natura* (aparência, volume, motilidade, vigor, grau de aglutinação e concentração), o material foi diluído em solução 1:1 com o diluente BTS (25 mL de sêmen e 25 mL de BTS).

Após a diluição, a dose de sêmen foi mantida em temperatura ambiente em local protegido da luz durante 90 minutos. Em seguida, a dose foi armazenada em geladeira à 15 °C por 180 minutos.

Após este período, a solução foi fracionada em cinco tubos de ensaio e submetida à centrifugação (1612,8 g por 10 minutos) para a retirada do plasma seminal (sobrenadante). O sedimento de espermatozoides foi então ressuspenso em 7,5 mL de diluidor de resfriamento (40 mL de lactose 11%, 10 mL de gema de ovo e 0,005 g de antibiótico - Ampicilina), esse procedimento foi realizado à temperatura de 15 °C. Em seguida, determinou-se a concentração espermática em espectrofotômetro e se calculou o volume necessário de diluidor de resfriamento que deveria ser adicionado para obter uma concentração final de  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL. Logo após, retirou-se 10 mL que foram resfriados à 5°C durante 90 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente

ressuspensas em 5,0 mL, agora no diluidor de congelamento (28,95 mL de diluidor de resfriamento, 0,15 mL de *Orvus Es Paste - Equex-Paste*, Ref.13760/0030, Minitüb Afüll-und Labortechnik GmbH & Co.KG - e 0,9 mL de glicerol), de modo que se obteve uma concentração final de  $1,0 \times 10^9$  espermatozoides/mL.

A seguir, o sêmen foi envasado, com auxílio de uma seringa, em palhetas de 0,5 mL à concentração de  $500 \times 10^6$  espermatozoides/palheta. Esse procedimento foi realizado à temperatura de 5 °C e foram feitas 15 palhetas de cada ejaculado.

Posteriormente, foi adicionada uma quantidade de nitrogênio líquido em uma caixa de isopor com medidas internas de 33 cm de comprimento, 20,5 de largura e 27 de altura contendo um cano plástico de 14 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro acoplado à tampa com a finalidade de controlar a saída de vapor de nitrogênio e, conseqüentemente, a queda de temperatura. Essa caixa de isopor também continha um termômetro acoplado à tampa. No interior da caixa, havia uma grade de 17,5 cm de altura, acima da qual as palhetas foram dispostas. Essa grade tinha a função de deixar as palhetas distantes do nitrogênio líquido (aproximadamente 15,5 cm de distância) de forma que as palhetas entrassem em contato somente com o vapor de nitrogênio. Após colocar o nitrogênio líquido e as palhetas no interior da caixa de isopor e tampá-la, a temperatura decresceu de 5 °C a -5 °C, sendo aproximadamente 3 °C por minuto. O artefato utilizado para diminuir a temperatura das palhetas para -5 °C foi chamado de “biocongelador grande” e pode ser visualizado na Figura 1.

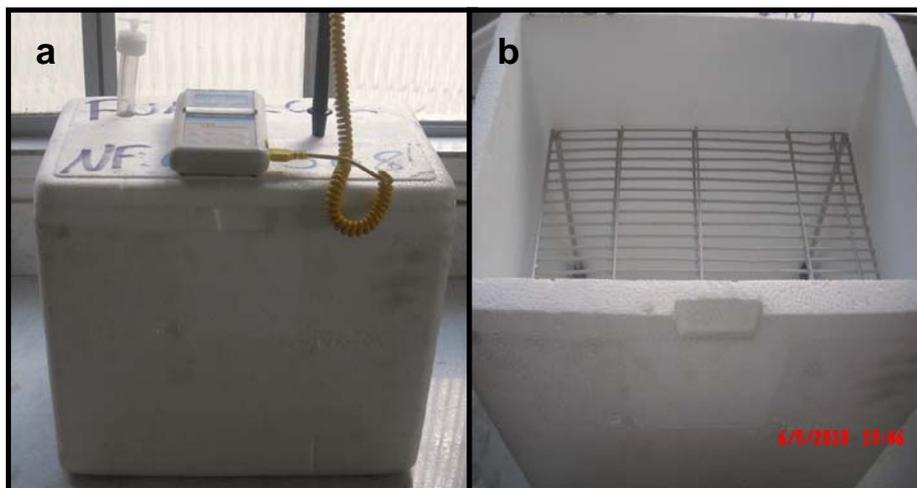


Figura 1 “Biocongelador grande”. a) Vista externa e b) vista interna

Após o termômetro marcar  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , adicionou-se uma quantidade de nitrogênio líquido em outra caixa de isopor com medidas internas de 19,5 cm de comprimento, 10,5 de largura e 14,5 de altura contendo apenas um termômetro acoplado à tampa. No interior da caixa, havia uma grade de 3,5 cm de altura, na qual palhetas foram dispostas. Essa grade tinha a função de deixar as palhetas distantes do nitrogênio líquido em aproximadamente 0,5 cm, de forma que as mesmas entrassem em contato somente com o vapor de nitrogênio. Após colocar o nitrogênio líquido e as palhetas no interior da caixa de isopor e tampá-la, a temperatura das palhetas decresceu de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em escala de aproximadamente  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto. O artefato utilizado para diminuir a temperatura das palhetas para  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi chamado de “biocongelador pequeno” e pode ser visualizado na Figura 2.

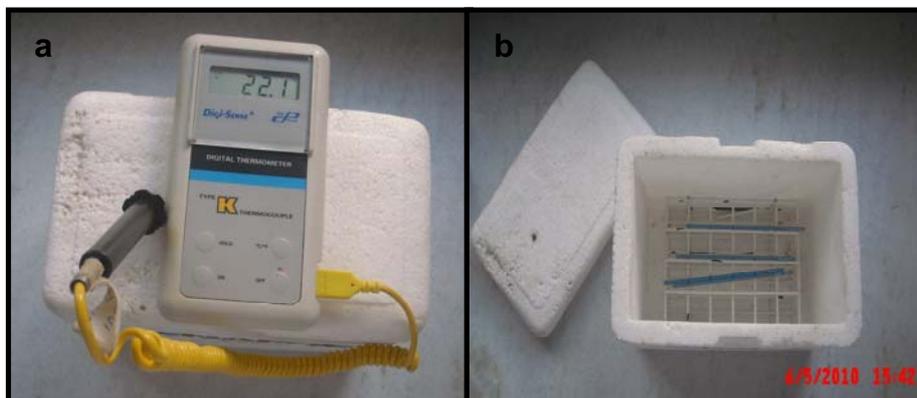


Figura 2 “Biocongelador pequeno”. a) Vista externa e b) vista interna

As duas curvas de congelamento utilizadas foram propostas por Murgas et al. (2001).

Após o termômetro marcar  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as palhetas foram introduzidas em botijão de nitrogênio líquido à temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O botijão foi transportado para o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal da UFPA, onde foi realizado o descongelamento do sêmen e a adição de IGF-I às amostras.

O descongelamento foi realizado em banho-maria a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante oito segundos sendo, em seguida, o conteúdo de uma palheta diluído em 10 mL de diluidor BTS à temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram adicionadas as diferentes concentrações de IGF-I humano recombinante: 0; 50, 100 e 150 ng/mL. Após a adição do hormônio, em cada alíquota reaquecida, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nos tempos 0 e 120 minutos de incubação, também foram realizados o teste de vivos e mortos, resistência osmótica, morfologia espermática, peroxidação lipídica, atividade da glutatona peroxidase e consumo de frutose pelos espermatozoides. Todas essas análises foram realizadas como descrito no experimento II.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com

quatro tratamentos (concentrações de IGF-I) e sete repetições (animais) com parcelas subdivididas no tempo. Apenas para a variável consumo de frutose, as parcelas não foram subdivididas no tempo.

### **3.6 Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistical Analysis System, SAS (1996), utilizando-se 5% de probabilidade.

a) Experimento I: foi realizada correlação de Spearman (dados não paramétricos) entre os parâmetros seminais e a concentração de IGF-I no plasma seminal, visto que os dados obtidos para as variáveis analisadas não atingiram distribuição normal.

b) Experimento II: realizou-se análise de variância dos dados obtidos para motilidade, teste de vivos e mortos, resistência osmótica e consumo de frutose pelos espermatozoides após o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias foram submetidas à análise de regressão. Os dados obtidos para peroxidação lipídica e atividade da glutatona peroxidase foram transformados pela opção raiz quadrada. Os dados de vigor espermático e parâmetros morfológicos foram submetidos à análise não paramétrica, visto que não atingiram a normalidade mesmo após a transformação e as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

c) Experimento III: os dados referentes à motilidade, vigor espermático e parâmetros morfológicos foram analisados de forma não paramétrica, visto que não atingiram a normalidade mesmo após a transformação e as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Realizou-se análise de variância dos dados obtidos para teste de vivos e mortos, resistência osmótica e consumo de frutose após o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias foram submetidas à análise de regressão. As médias obtidas para peroxidação lipídica e

atividade da glutathione peroxidase foram transformadas pela opção raiz quadrada.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I: Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e a sua influência nos parâmetros seminais *in natura*

Os dados da correlação entre a concentração de IGF-I e os parâmetros seminais *in natura* de suínos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Médias, desvio padrão (DP) e valores de correlação entre a concentração de IGF-I no plasma seminal e os parâmetros seminais *in natura* de suínos – Brasil – 2010 (n=27).

| Variável   | Médias | DP    | Correlação | P=   |
|--|--------|-------|------------|------|
| Concentração de IGF-I (ng/mL)                      | 1,5    | 0,7   | 1,0000     | 0,00 |
| Aparência do ejaculado                             | 2,6    | 0,4   | 0,0329     | 0,87 |
| Peso do ejaculado (g)                              | 292,6  | 162,5 | -0,0302    | 0,88 |
| Motilidade espermática (%)                         | 81,9   | 7,9   | 0,0486     | 0,81 |
| Vigor espermático                                  | 3,2    | 0,4   | 0,0787     | 0,70 |
| Grau de aglutinação (aglutinações/campo)           | 2,3    | 2,0   | 0,0719     | 0,72 |
| Teste de vivos e mortos (%)                        | 88,8   | 5,9   | -0,4517    | 0,02 |
| Concentração espermática (10 <sup>6</sup> sptz/mL) | 405,1  | 115,3 | 0,0086     | 0,97 |
| Taxa de degradação da motilidade (%)               | 19,5   | 19,5  | 0,0590     | 0,77 |
| Teste de resistência osmótica (%)                  | 88,4   | 6,8   | -0,1879    | 0,35 |
| Acrossomas anormais (%)                            | 1,4    | 1,2   | 0,0684     | 0,73 |
| Caudas anormais (%)                                | 8,4    | 4,2   | 0,1097     | 0,59 |
| Gota citoplasmática proximal (%)                   | 0,6    | 0,9   | 0,0207     | 0,92 |
| Total de anormalidades (%)                         | 10,8   | 4,6   | 0,0318     | 0,88 |

Foi encontrada média de 1,5 ng/mL de IGF-I no plasma seminal *in natura* de suínos, o que é uma quantidade pequena quando comparada com

sêmen de equinos (cerca de 10 ng/mL) e bovinos (aproximadamente 130,0 ng/mL) de acordo com Macpherson et al., (2002) e Henricks et al., (1998). Isso pode ter acontecido devido ao kit ELISA utilizado para quantificar IGF-I no plasma seminal de suínos neste trabalho ser específico para humanos.

Não houve correlação ( $P > 0,05$ ) do IGF-I com a maioria dos parâmetros estudados. Houve apenas baixa correlação negativa ( $P < 0,05$ ) entre a concentração de IGF-I no plasma seminal e o teste de vivos e mortos, o que representa queda da viabilidade espermática com o aumento da concentração do hormônio no plasma seminal. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que o IGF-I desempenha uma função semelhante à da insulina, ou seja, captura os nutrientes como aminoácidos e açúcares presentes no plasma seminal e facilita a passagem desses nutrientes para o interior das células espermáticas. Sendo assim, com o aumento do IGF-I no plasma seminal, o aproveitamento de nutrientes pode se tornar mais rápido, fazendo com que os espermatozoides gastem muita energia e liberem radicais livres também de forma rápida, resultando na morte precoce dessas células.

Como o teste de vivos e mortos é uma análise complementar à motilidade espermática, esses resultados contrastaram com os encontrados por Macpherson et al. (2002). Esses autores afirmaram que existe correlação positiva entre a concentração de IGF-I no plasma seminal e a motilidade e morfologia espermática em equinos. Brito et al. (2007) também encontraram essa mesma associação, porém no sêmen bovino. Selvaraju et al. (2009) averiguaram que o IGF-I exerce efeito positivo na motilidade e na integridade da membrana acrossômica de espermatozoides de búfalos. Provavelmente possa haver maior importância deste hormônio na fisiologia espermática destas espécies do que em suínos.

Como se observou na Tabela 2 encontrou-se valor médio de 88,4% de espermatozoides resistentes ao choque hiposmótico. Resultado semelhante foi

encontrado por Alvarenga, Murgas e Zangeronimo (2009), quando utilizaram diferentes diluentes em quatro volumes distintos de sêmen suíno. O espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extras e intracelulares (SANTOS et al., 2001). Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular, com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

Neste trabalho, todos os valores dos parâmetros seminais se situaram dentro de faixas tecnicamente aceitáveis (Tabela 1), confirmando que os animais utilizados no experimento possuíam características sexuais normais e estavam aptos para a reprodução.

#### **4.2 Experimento II: Adição de IGF-I ao sêmen suíno resfriado**

Os resultados obtidos para a motilidade espermática do sêmen suíno resfriado adicionado de IGF-I estão apresentados na Tabela 3.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para a motilidade espermática após a adição de diferentes concentrações de IGF-I nos tempos 24, 48 e 72 horas de armazenamento. Nas pesquisas de Henricks et al. (1998), onde os autores adicionaram IGF-I ao sêmen bovino *in vitro*, ocorreu aumento da motilidade espermática total e progressiva quando comparado com o sêmen sem adição do hormônio. Por outro lado, não foi encontrada correlação entre a concentração de IGF-I sanguíneo e os parâmetros seminais em varrões (HOSSENLOPP et al., 1986). A divergência de resultados pode estar relacionada com as diferentes metodologias e espécies de animais utilizadas nos estudos, além disso, a concentração de receptores e do próprio hormônio podem influenciar os resultados das pesquisas. No entanto, na maioria dos trabalhos encontrados na

literatura (BREIER et al., 1996; GRAVANCE et al., 1997; MACPHERSON et al., 2002; VICKERS et al., 1999), o IGF-I presente no plasma seminal está associado positivamente com a motilidade espermática, sendo que isso pode ser devido à melhoria de aproveitamento de nutrientes energéticos presentes nesse plasma seminal.

Tabela 3 Motilidade espermática (%) em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) e de incubação (37 °C) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de Incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL) |      |      |      | Média <sup>1</sup> |
|--------------------------------------|---------------|------|------|------|--------------------|
|                                      | 0             | 50   | 100  | 150  |                    |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |                    |
| 0                                    | 87,9          | 89,3 | 85,7 | 84,3 | 86,8               |
| 30                                   | 82,9          | 82,9 | 82,9 | 83,6 | 83,0               |
| 60                                   | 81,4          | 80,7 | 81,4 | 77,1 | 80,2               |
| 90                                   | 77,9          | 72,9 | 78,6 | 75,7 | 76,3               |
| 120                                  | 72,1          | 60,0 | 70,7 | 63,6 | 66,6               |
| Média                                | 80,4          | 77,1 | 79,9 | 76,9 |                    |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |                    |
| 0                                    | 84,3          | 82,1 | 84,3 | 82,9 | 83,4               |
| 30                                   | 82,9          | 81,4 | 82,9 | 82,9 | 82,5               |
| 60                                   | 74,3          | 77,1 | 75,0 | 76,4 | 75,7               |
| 90                                   | 70,0          | 72,1 | 67,1 | 69,3 | 69,6               |
| 120                                  | 60,0          | 64,3 | 65,7 | 67,1 | 64,3               |
| Média                                | 74,3          | 75,4 | 75,0 | 75,7 |                    |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |                    |
| 0                                    | 76,4          | 77,1 | 78,6 | 78,6 | 77,7               |
| 30                                   | 74,3          | 74,3 | 77,1 | 72,9 | 74,6               |
| 60                                   | 54,3          | 65,7 | 67,9 | 71,4 | 64,8               |
| 90                                   | 42,9          | 52,1 | 55,0 | 58,6 | 52,1               |
| 120                                  | 44,3          | 46,4 | 52,9 | 55,0 | 49,6               |
| Média                                | 58,4          | 63,1 | 66,3 | 67,3 |                    |
| CV (%)                               | 11,5          |      |      |      |                    |

<sup>1</sup>Regressão linear significativa (P<0,05)

O fato de não ter ocorrido melhora da motilidade de espermatozoides nesse estudo pode estar associada à quantidade de receptores para esse hormônio na membrana da célula espermática suína, pois, se existir um número pequeno destes, a adição do hormônio pouco ou não influencia na captação do hormônio. Em bovinos, existe em média 1000 receptores para IGF-I em cada célula espermática (HENRICKS et al., 1998), porém ainda não se sabe a quantidade de receptores para IGF-I presente em espermatozoides de suínos. De acordo com Vickers et al. (1999), o efeito do IGF-I na melhoria da motilidade e da morfologia espermática está diretamente relacionado com o IGF-I presente no líquido da vesícula seminal e com os receptores para IGF-I nos espermatozoides.

Verificou-se regressão linear ( $P < 0,05$ ) para o período de incubação, demonstrando que à medida que se aumentou o tempo de incubação, diminuiu-se a motilidade espermática, independentemente do tempo de armazenamento e da concentração de IGF-I adicionada. Também se pode observar que houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os três tempos de armazenamento estudados e que o IGF-I não influenciou no decréscimo natural da motilidade espermática.

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados obtidos para o vigor espermático do sêmen resfriado adicionado de IGF-I.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para o vigor espermático após a adição de diferentes doses de IGF-I, independentemente do tempo de armazenamento e do período de incubação. Como no caso da motilidade espermática, isso pode ter acontecido devido ao número de receptores para IGF-I.

Às 24 horas de armazenamento, houve menor vigor espermático ( $P < 0,01$ ) aos 120 minutos de incubação quando comparado aos tempos 0 e 30 minutos. Às 48 horas de armazenamento, o vigor espermático no tempo 0 de incubação foi maior ( $P < 0,01$ ) que no tempo 60 que, por sua vez, foi superior ao tempo 120. Às 72 horas de armazenamento, nos três últimos tempos de incubação, houve menor vigor espermático ( $P < 0,01$ ) quando comparado com os

dois primeiros períodos de incubação. Essa queda do vigor dos espermatozoides à medida que se aumentou o tempo de incubação a 37 °C foi independente da adição do IGF-I. Vasconcelos et al. (2001) também verificaram que, no sêmen suíno diluído mantido à 37 °C, existe queda do vigor espermático com o passar do tempo e isso provavelmente acontece devido ao tempo de vida útil dos espermatozoides.

Tabela 4 Vigor espermático em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) e de incubação (37 °C) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de Incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL) |      |      |      | Média   |
|--------------------------------------|---------------|------|------|------|---------|
|                                      | 0             | 50   | 100  | 150  |         |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |         |
| 0                                    | 3,14          | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,04 a  |
| 30                                   | 3,00          | 2,86 | 3,00 | 2,86 | 2,93 ab |
| 60                                   | 2,71          | 2,57 | 2,71 | 2,71 | 2,68 ab |
| 90                                   | 2,71          | 2,43 | 2,71 | 2,57 | 2,61 ab |
| 120                                  | 2,57          | 2,00 | 2,43 | 2,00 | 2,25 b  |
| Média                                | 2,83          | 2,57 | 2,77 | 2,63 |         |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |         |
| 0                                    | 3,00          | 3,00 | 3,14 | 3,00 | 3,04 a  |
| 30                                   | 2,71          | 2,86 | 2,86 | 2,57 | 2,75 ab |
| 60                                   | 2,43          | 2,29 | 2,57 | 2,43 | 2,43 b  |
| 90                                   | 2,29          | 2,29 | 1,86 | 2,00 | 2,11 bc |
| 120                                  | 1,57          | 1,71 | 2,00 | 1,43 | 1,86 c  |
| Média                                | 2,40          | 2,43 | 2,49 | 2,29 |         |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |         |
| 0                                    | 3,00          | 3,00 | 3,00 | 2,86 | 2,96 a  |
| 30                                   | 2,57          | 2,29 | 2,43 | 2,43 | 2,43 a  |
| 60                                   | 1,57          | 1,43 | 2,00 | 1,86 | 1,71 b  |
| 90                                   | 1,43          | 1,29 | 1,43 | 1,43 | 1,39 b  |
| 120                                  | 1,29          | 1,14 | 1,29 | 1,43 | 1,29 b  |
| Média                                | 1,97          | 1,83 | 2,03 | 2,00 |         |

<sup>1</sup>Médias seguidas de diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Walis (P<0,01)

Na Tabela 5, encontram-se os dados do teste de vivos e mortos para o sêmen suíno após a adição de IGF-I.

Observa-se que às 72 horas de armazenamento, com 0 e com 50 ng/mL de IGF-I, à medida que aumentou o tempo de incubação, diminuiu a viabilidade espermática, porém, a partir do momento em que se adicionou doses maiores de IGF-I (100 ou 150 ng/mL), a viabilidade espermática se manteve independentemente do período de incubação e isto comprova o efeito do IGF-I sobre o teste de vivos e mortos, principalmente quando o sêmen diluído está armazenado por um período relativamente longo e isso poderia melhorar a fertilização utilizando esse tipo de sêmen. No sêmen suíno *in natura* (Tabela 2), verificou-se correlação negativa entre teste de vivos e mortos e concentração de IGF-I no plasma seminal, sendo que o efeito do hormônio pareceu estar mais relacionado ao metabolismo energético dos espermatozoides, porém o efeito do IGF-I no parâmetro de viabilidade espermática do sêmen suíno processado (resfriado ou congelado) pode estar associado à função antioxidante do hormônio, pois as membranas dos espermatozoides são sensíveis a baixas temperaturas. Segundo Leidl et al. (1993) e Wainer et al. (1996), a ação antioxidante do IGF-I pode resultar no aumento da viabilidade espermática.

No estudo de Minelli, Moroni e Castellini (2001), em que incubaram espermatozoides de coelho com um complexo de IGF-I (150 kDa) purificado do plasma seminal desses animais, os autores observaram aumento significativo na viabilidade e na motilidade dos espermatozoides.

Às 48 horas de armazenamento, quando se adicionou 50 ng/mL de IGF-I, houve queda da viabilidade espermática à medida que aumentou o período de incubação.

Houve aumento linear ( $P < 0,05$ ) da viabilidade espermática com a adição de IGF-I às 72 horas de armazenamento, detectado aos 120 minutos de incubação.

Também se pode observar que houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os três tempos de armazenamento estudados e que o IGF-I, assim como na motilidade espermática, não influenciou nesse decréscimo natural da viabilidade espermática do sêmen resfriado.

Tabela 5 Espermatozoides vivos (%) em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) e de incubação (37 °C) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL)  |                 |      |      | Média |
|--------------------------------------|----------------|-----------------|------|------|-------|
|                                      | 0 <sup>1</sup> | 50 <sup>1</sup> | 100  | 150  |       |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |                |                 |      |      |       |
| 0                                    | 87,6           | 88,4            | 89,4 | 89,0 | 88,6  |
| 120                                  | 88,2           | 86,0            | 86,9 | 87,8 | 87,2  |
| Média                                | 87,9           | 87,2            | 88,1 | 88,4 |       |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |                |                 |      |      |       |
| 0                                    | 86,3           | 90,7 a          | 86,2 | 89,9 | 88,3  |
| 120                                  | 86,3           | 86,5 b          | 88,3 | 88,2 | 87,3  |
| Média                                | 86,3           | 88,6            | 87,3 | 89,0 |       |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |                |                 |      |      |       |
| 0                                    | 89,3 a         | 87,8 a          | 86,0 | 87,7 | 87,7  |
| 120 <sup>2</sup>                     | 81,9 b         | 82,6 b          | 87,6 | 85,3 | 84,3  |
| Média                                | 85,6           | 85,2            | 86,8 | 86,5 |       |
| CV (%)                               | 4,39           |                 |      |      |       |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup>Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

A Tabela 6 contém os dados referentes ao teste de resistência osmótica.

Observou-se efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) às 72 horas de armazenamento independentemente do período de incubação, sendo que a partir da equação quadrática ( $y = - 0,0005x^2 + 0,0674x + 91,52$ ;  $R^2 = 0,95$ ), estimou-se que o nível

de 67 ng/mL de IGF-I adicionado ao sêmen possibilita melhor resistência osmótica dos espermatozoides (Figura 3).

Selvaraju et al. (2009), ao adicionar 100 ng/mL de IGF-I no sêmen bubalino descongelado, verificaram aumento da resistência osmótica nos tempos 60 e 90 minutos de incubação quando comparado ao grupo controle (sem adição de IGF-I) e afirmaram que essa maior integridade da membrana espermática do sêmen tratado com IGF-I indica que a adição desse hormônio pode ser útil para a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Além disso, os autores também sugeriram um importante papel antioxidante do IGF-I na estabilidade das membranas.

Tabela 6 Resistência osmótica (%) dos espermatozoides em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) e de incubação (37 °C) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL) |      |      |      | Média |
|--------------------------------------|---------------|------|------|------|-------|
|                                      | 0             | 50   | 100  | 150  |       |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |       |
| 0                                    | 92,0          | 92,6 | 91,9 | 93,6 | 92,5  |
| 120                                  | 91,1          | 92,3 | 92,9 | 93,3 | 92,4  |
| Média                                | 91,6          | 92,4 | 92,4 | 93,4 |       |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |       |
| 0                                    | 93,0          | 94,7 | 90,4 | 93,5 | 92,9  |
| 120                                  | 94,3          | 91,3 | 93,0 | 92,0 | 92,7  |
| Média                                | 93,7          | 93,0 | 91,7 | 92,8 |       |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |               |      |      |      |       |
| 0                                    | 92,0          | 95,1 | 92,9 | 92,0 | 93,0  |
| 120                                  | 90,7          | 93,0 | 93,7 | 90,7 | 92,0  |
| Média <sup>1</sup>                   | 91,4          | 94,1 | 93,3 | 91,4 |       |
| CV (%)                               | 3,63          |      |      |      |       |

<sup>1</sup>Regressão quadrática significativa (P<0,05)

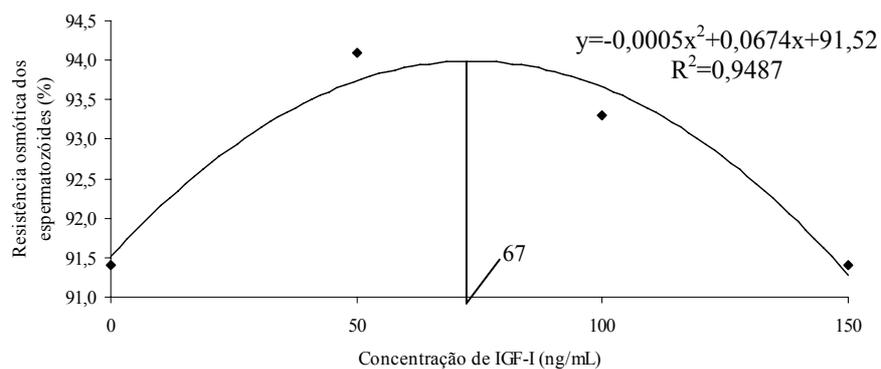


Figura 3. Resistência osmótica de espermatozoides do sêmen suíno às 72 horas de armazenamento (15 °C) adicionado de IGF-I

Na Tabela 7, estão apresentados os resultados obtidos para o total de anormalidades morfológicas nas amostras.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) após a adição de diferentes doses de IGF-I, independentemente do tempo de armazenamento e do período de incubação. No entanto, a concentração de IGF-I no plasma seminal de humanos foi correlacionada ( $r = 0,748$ ) com a morfologia espermática, mostrando que quanto maior é a concentração de IGF-I, menor é o porcentual de formas anormais (GLANDER et al., 1996).

Tabela 7 Total de anormalidades na morfologia espermática (%) em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) e de incubação (37 °C) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL) |       |         |       | Média |
|--------------------------------------|---------------|-------|---------|-------|-------|
|                                      | 0             | 50    | 100     | 150   |       |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |               |       |         |       |       |
| 0                                    | 4,57          | 4,86  | 5,57    | 6,86  | 5,46  |
| 120                                  | 6,00          | 5,57  | 7,57    | 6,57  | 6,43  |
| Média                                | 5,29          | 5,21  | 6,57    | 6,71  |       |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |               |       |         |       |       |
| 0                                    | 11,71         | 7,14  | 5,86 b  | 9,71  | 8,61  |
| 120                                  | 12,86         | 6,71  | 10,57 a | 12,14 | 10,57 |
| Média                                | 12,29         | 6,93  | 8,21    | 10,93 |       |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |               |       |         |       |       |
| 0                                    | 10,86         | 9,29  | 7,86 b  | 9,57  | 9,40  |
| 120                                  | 11,71         | 10,57 | 12,71 a | 11,71 | 11,68 |
| Média                                | 11,29         | 9,93  | 10,29   | 10,64 |       |
| P=                                   | 0,0399        |       |         |       |       |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Walis (P<0,05)

Como foram observadas mais anormalidades morfológicas aos 120 minutos de incubação do que ao 0 minuto e devido à improvável capacidade do IGF-I alterar a morfologia espermática imediatamente após seu contato com o sêmen, na Tabela 8, estão apresentados os resultados obtidos para a quantidade de anormalidades de cabeça (pequena, grande, isolada, piriforme e alterações na integridade acrossômica) e de cauda (enrolada, isolada, enovelada, quebrada e presença de GCP) no sêmen suíno em três diferentes tempos de armazenamento apenas aos 120 minutos de incubação.

Ao se adicionar 150 ng/mL de IGF-I, a maior quantidade de alterações

de cabeça ocorre às 72 horas, quando comparado às 24 horas de armazenamento ( $P < 0,05$ ). Selvaraju et al. (2009) não encontraram diferença na integridade acrossômica ao adicionar 100 ng/mL de IGF-I ao sêmen bubalino descongelado. Por lado, Minelli et al. (2001), ao incubar sêmen de coelhos com um complexo purificado de IGF-I, verificaram maior quantidade de alterações na integridade acrossômica, comprovando que o IGF-I atuou como indutor da reação acrossômica.

Para alterações de cauda, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as doses de IGF-I ou entre os tempos de armazenamento.

Tabela 8 Anormalidades de cabeça (%) e de cauda espermática (%) em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) do sêmen suíno adicionado de IGF-I e submetido a 120 minutos de incubação a 37 °C – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de armazenamento (horas)     | IGF-I (ng/mL) |      |      |                  | Média |
|------------------------------------|---------------|------|------|------------------|-------|
|                                    | 0             | 50   | 100  | 150 <sup>1</sup> |       |
| <i>- Anormalidades de cabeça -</i> |               |      |      |                  |       |
| 24                                 | 0,14          | 0,14 | 1,14 | 0,86 b           | 0,57  |
| 48                                 | 1,43          | 1,00 | 1,14 | 1,86 ab          | 1,36  |
| 72                                 | 2,00          | 2,00 | 2,43 | 3,29 a           | 2,43  |
| Média                              | 0,71          | 1,05 | 1,57 | 2,00             | 0,71  |
| P=                                 | 0,0001        |      |      |                  |       |
| <i>- Anormalidades de cauda -</i>  |               |      |      |                  |       |
| 24                                 | 5,86          | 5,43 | 6,43 | 5,57             | 5,82  |
| 48                                 | 8,57          | 5,71 | 9,43 | 5,86             | 7,39  |
| 72                                 | 11,29         | 7,86 | 9,29 | 7,71             | 9,04  |
| Média                              | 8,57          | 6,33 | 8,38 | 6,38             |       |
| P=                                 | 0,2886        |      |      |                  |       |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Walis ( $P < 0,05$ )

Na Tabela 9, observa-se a taxa de peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides suínos. Através do desdobramento das interações, observou-se que, às 24 horas de armazenamento, houve regressão linear ( $P < 0,05$ ) nos dois tempos de incubação. Ao início do período de incubação, à medida que se aumentou o IGF-I, também aumentou a peroxidação lipídica. No entanto, aos 120 minutos, à medida que se aumentou a dose de hormônio, diminuiu a peroxidação. O mesmo aconteceu quando o sêmen ficou armazenado durante 48 horas. Alguns estudos têm demonstrado peroxidação lipídica na membrana como uma das causas de defeito na função espermática do sêmen diluído e armazenado a 4 °C (VISHWANATH; SHANNON, 2000) e do sêmen criopreservado (CHARTTERGEE; GAGNON, 2001).

Depois de 72 horas de armazenamento, houve regressão linear ( $P < 0,05$ ) apenas para o primeiro tempo de incubação.

Houve aumento ( $P < 0,05$ ) da peroxidação lipídica com o passar do tempo de incubação do sêmen sem IGF-I, armazenado durante 24 e 48 horas. No entanto, quando se adicionou 150 ng/mL de IGF-I houve queda da peroxidação à medida que aumentou o período de incubação. Isso sugere o efeito do IGF-I como agente antioxidante atuando na membrana de espermatozoides de suínos após um período de incubação. Stewart et al. (1996) afirmaram que, além do IGF-I estar associado com o metabolismo energético da célula espermática, ele também age como antioxidante. A peroxidação lipídica e as espécies reativas ao oxigênio podem danificar gravemente o metabolismo, resultando na perda da motilidade espermática entre outras funções dos espermatozoides (AITKEN, 1994).

Segundo Faustini et al. (2004), a integridade da membrana espermática é essencial para a sobrevivência das células e para o correto funcionamento das mesmas. Esses autores ainda afirmaram que a peroxidação lipídica é uma das

causas mais deletérias para a membrana. Essa peroxidação pode danificar a estrutura das organelas celulares, além da membrana plasmática e do DNA (NEIDL et al., 2002).

Tabela 9 Peroxidação lipídica ( $\mu\text{Mol}$  equivalente) em diferentes tempos de armazenamento ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e de incubação ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL) <sup>1</sup> |       |       |         | Média |
|--------------------------------------|----------------------------|-------|-------|---------|-------|
|                                      | 0                          | 50    | 100   | 150     |       |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |                            |       |       |         |       |
| 0 <sup>2</sup>                       | 185,3 b                    | 279,3 | 263,1 | 307,1 a | 258,7 |
| 120 <sup>2</sup>                     | 343,8 a                    | 308,8 | 223,5 | 244,0 b | 280,0 |
| Média                                | 264,6                      | 294,1 | 243,3 | 275,6   |       |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |                            |       |       |         |       |
| 0 <sup>2</sup>                       | 248,8 b                    | 363,8 | 330,6 | 451,2 a | 348,6 |
| 120 <sup>2</sup>                     | 425,7 a                    | 306,9 | 321,9 | 246,0 b | 325,1 |
| Média                                | 337,3                      | 335,4 | 326,3 | 348,6   |       |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |                            |       |       |         |       |
| 0 <sup>2</sup>                       | 245,3                      | 311,0 | 341,3 | 338,1   | 309,0 |
| 120                                  | 256,3                      | 226,7 | 316,7 | 303,3   | 275,8 |
| Média                                | 250,8                      | 268,9 | 329,0 | 320,7   |       |
| CV (%)                               | 13,45                      |       |       |         |       |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P<0,05$ )

<sup>2</sup>Regressão linear significativa ( $P<0,05$ )

Os resultados obtidos para atividade da glutathiona peroxidase estão apresentados na Tabela 10.

Às 24 horas de armazenamento, quando não se adicionou IGF-I, houve aumento ( $P<0,05$ ) da atividade da enzima quando se aumentou o tempo de incubação. Isso pode ser explicado devido ao maior tempo de exposição da enzima a uma temperatura mais elevada o que naturalmente provoca maior

ativação. Aos 120 minutos de incubação, houve regressão linear ( $P < 0,05$ ), verificando que à medida que se aumentou a dosagem do hormônio, diminuiu-se a atividade da enzima. Nesse mesmo período de incubação e tempo de armazenamento, observou-se queda da peroxidação lipídica (Tabela 9) através da adição de IGF-I, sendo assim, como o próprio hormônio foi eficaz em relação à diminuição da peroxidação da membrana espermática, pode ser que não houve necessidade de ativar a enzima glutathiona peroxidase, a qual desempenharia essa mesma função de evitar a peroxidação lipídica.

Tabela 10 Atividade da glutathiona peroxidase (unidades/mL) em diferentes tempos de armazenamento (15 °C) e de incubação (37 °C) no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)         | IGF-I (ng/mL) <sup>1</sup> |        |      |        | Média |
|--------------------------------------|----------------------------|--------|------|--------|-------|
|                                      | 0                          | 50     | 100  | 150    |       |
| <i>- 24 horas de armazenamento -</i> |                            |        |      |        |       |
| 0                                    | 6,47 b                     | 5,77   | 6,84 | 6,80   | 6,47  |
| 120 <sup>2</sup>                     | 9,49 a                     | 4,84   | 5,69 | 5,60   | 6,40  |
| Média                                | 7,98                       | 5,31   | 6,26 | 6,20   |       |
| <i>- 48 horas de armazenamento -</i> |                            |        |      |        |       |
| 0 <sup>2</sup>                       | 5,41                       | 5,80 b | 7,29 | 7,84   | 6,59  |
| 120 <sup>3</sup>                     | 6,53                       | 9,70 a | 7,89 | 7,33   | 7,86  |
| Média                                | 5,97                       | 7,75   | 7,59 | 7,59   |       |
| <i>- 72 horas de armazenamento -</i> |                            |        |      |        |       |
| 0                                    | 5,30 b                     | 7,47   | 5,61 | 6,50 b | 6,22  |
| 120 <sup>3</sup>                     | 9,27 a                     | 6,17   | 4,60 | 9,79 a | 7,46  |
| Média                                | 7,29                       | 6,82   | 5,11 | 8,14   |       |
| CV (%)                               | 11,37                      |        |      |        |       |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup>Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

<sup>3</sup>Regressão quadrática significativa ( $P < 0,05$ )

Segundo Alvarez e Storey (1989), as enzimas como superóxido

desmutase e catalase também estão presentes no plasma seminal para conter os efeitos das espécies reativas ao oxigênio na peroxidação lipídica e prevenir danos aos espermatozoides.

Às 48 horas de armazenamento, houve aumento linear ( $P < 0,05$ ) da atividade da glutathiona peroxidase com o aumento do IGF-I logo após sua adição (tempo 0). Aos 120 minutos de incubação, houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ), sendo obtida a equação  $y = -0,0004x^2 + 0,0571x + 6,8415$  ( $R^2 = 0,64$ ), a qual possibilitou que fosse estimada a concentração de IGF-I a ser adicionada ao sêmen para que a glutathiona peroxidase apresentasse a melhor atividade (Figura 4).

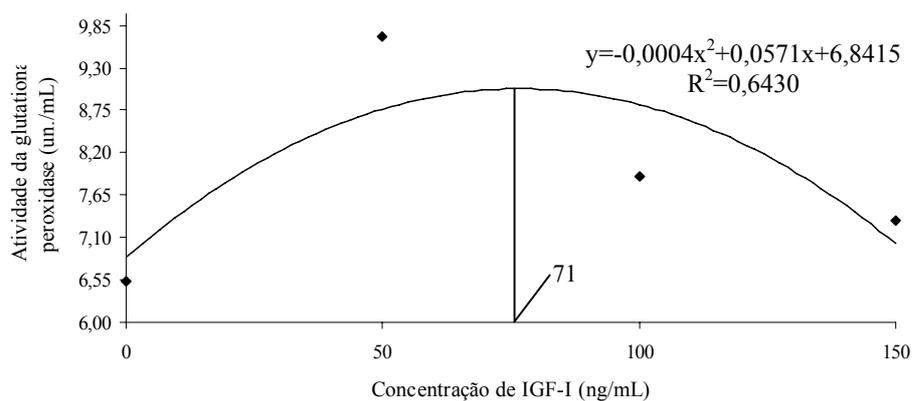


Figura 4. Atividade da glutathiona peroxidase do sêmen suíno às 48 horas de armazenamento (15 °C) e 120 minutos de incubação (37 °C) adicionado de IGF-I

A partir desta equação, pode-se inferir que a adição de 71 ng/mL de IGF-I ao sêmen possibilita maior AGP. Kobayashi et al. (1991), ao acrescentar antioxidantes exógenos em amostras de sêmen promoveram aumento da motilidade espermática e queda da concentração de malondialdeído.

Além disso, observou-se que ao adicionar 50 ng/mL de IGF-I, houve maior atividade enzimática aos 120 minutos de incubação quando comparado com o período de 0 minuto.

Às 72 horas de armazenamento, também houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) aos 120 minutos de incubação, sendo que, ao adicionar 150 ng/mL de IGF-I obteve-se a melhor atividade da glutatona peroxidase (Figura 5). Com os tratamentos 0 e 150 ng/mL de IGF-I houve maior atividade enzimática aos 120 minutos de incubação quando comparado com o período de 0 minuto.

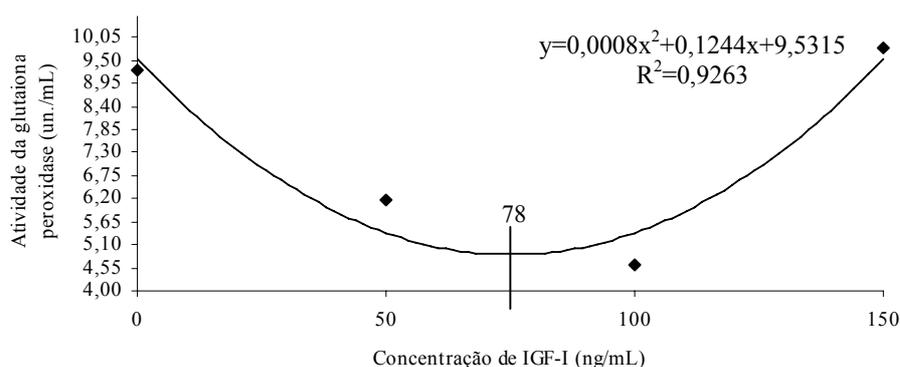


Figura 5. Atividade da glutatona peroxidase do sêmen suíno às 72 horas de armazenamento (15 °C) e 120 minutos de incubação (37 °C) adicionado de IGF-I

Os dados referentes ao consumo de frutose pelos espermatozoides que foram submetidos ao resfriamento e posteriormente foram adicionados de IGF-I encontram-se na Tabela 11.

Houve redução linear ( $P < 0,05$ ) do consumo de frutose pelos espermatozoides com o aumento do IGF-I no sêmen. Selvaraju et al. (2009), ao colocar 100 ng/mL de IGF-I no sêmen de búfalos, puderam relatar aumento do consumo de frutose pelos espermatozoides após 30 e 60 minutos de incubação. Além disso, esses mesmos autores verificaram aumento na motilidade

espermática devido ao maior consumo de frutose pelos espermatozoides.

Tabela 11 Consumo de frutose pelos espermatozoides (mmol/L) em diferentes tempos de armazenamento a 15 °C no sêmen suíno adicionado de IGF-I – Brasil – 2010 (n=7).

| Armazenamento      | IGF-I (ng/dL) |       |       |       | Média |
|--------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|
|                    | 0             | 50    | 100   | 150   |       |
| 24 horas           | 24,69         | 25,43 | 24,92 | 22,19 | 24,31 |
| 48 horas           | 24,18         | 23,10 | 25,91 | 22,87 | 24,02 |
| 72 horas           | 26,56         | 27,68 | 22,59 | 21,12 | 24,49 |
| Média <sup>1</sup> | 25,15         | 25,40 | 24,47 | 22,06 |       |
| CV (%)             | 17,63         |       |       |       |       |

<sup>1</sup>Regressão linear significativa (P<0,05)

#### 4.3 Experimento III: Adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado

A motilidade e vigor espermático do sêmen descongelado adicionado de IGF-I estão apresentados na Tabela 12.

A motilidade espermática do sêmen descongelado, no início da incubação, foi maior (P<0,01) quando se adicionou 100 ng/mL de IGF-I em relação ao sêmen que não recebeu o hormônio, tendo uma diferença de quase 10% na motilidade, o que é um aumento significativo considerando a sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo de congelamento/descongelamento. Selvaraju et al. (2009) também verificaram aproximadamente 10% de aumento na motilidade espermática após a adição de IGF-I no sêmen descongelado de búfalos, porém nos períodos 30, 60 e 90 minutos de incubação e ainda afirmaram que a influência do IGF-I na estimulação da motilidade pode ser devido ao efeito direto nos receptores para este hormônio presentes nos espermatozoides. O tratamento de ratos deficientes

em GH e de homens sub-férteis com o próprio GH melhorou a motilidade espermática, principalmente devido ao aumento da concentração de IGF-I no plasma seminal (BREIER et al., 1998; OVESEN et al., 1996).

Tabela 12 Motilidade (%) e vigor espermático em diferentes períodos de incubação (37 °C) após a adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de Incubação (minutos)      | IGF-I (ng/mL) |          |         |          | Média   |
|-----------------------------------|---------------|----------|---------|----------|---------|
|                                   | 0             | 50       | 100     | 150      |         |
| <i>- Motilidade Espermática -</i> |               |          |         |          |         |
| 0                                 | 15,00         | 17,50 ab | 23,33 a | 16,67 ab | 18,13 A |
| 30                                | 9,17          | 10,00    | 10,83   | 11,67    | 10,42 B |
| 60                                | 2,50          | 6,67     | 4,17    | 5,00     | 4,58 C  |
| 90                                | 3,33          | 5,83     | 3,33    | 2,50     | 3,75 C  |
| 120                               | 0,83          | 1,67     | 3,33    | 0,83     | 1,67 C  |
| Média                             | 6,17          | 8,33     | 9,00    | 7,33     |         |
| P=                                | 0,0000        |          |         |          |         |
| <i>- Vigor Espermático -</i>      |               |          |         |          |         |
| 0                                 | 3,00          | 3,00     | 3,00    | 3,00     | 3,00 A  |
| 30                                | 2,67          | 2,50     | 2,50    | 2,50     | 2,54 AB |
| 60                                | 0,83          | 1,50     | 1,17    | 1,33     | 1,21 BC |
| 90                                | 0,83          | 1,33     | 0,83    | 0,83     | 0,96 BC |
| 120                               | 0,17          | 0,50     | 1,00    | 0,50     | 0,54 C  |
| Média                             | 1,50          | 1,77     | 1,70    | 1,63     |         |
| P=                                | 0,0000        |          |         |          |         |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem pelo teste de Kruskal-Walis (P<0,01)

De forma geral, a motilidade foi mais alta no início do período de incubação quando comparado aos 30 minutos e esse, por sua vez, foi superior aos outros períodos de incubação. Champion et al. (2002) verificaram que o IGF-I pode ser usado seguramente para preservar a motilidade espermática durante o transporte à temperatura ambiente do sêmen equino diluído.

Quanto ao vigor espermático, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre as concentrações de IGF-I. Também foi verificado que, assim como na motilidade, à medida que se aumentou o período de incubação, diminuiu-se o vigor espermático ( $P<0,01$ ).

O teste de vivos e mortos e o teste de resistência osmótica do sêmen suíno descongelado e adicionado de IGF-I estão apresentadas na Tabela 13.

Houve efeito quadrático ( $P<0,05$ ) para o teste de vivos e mortos em relação às concentrações de IGF-I adicionadas, podendo-se observar que, dentre as doses adicionadas, a concentração de 150 ng/mL foi a que resultou em maior viabilidade espermática (Figura 6).

Tabela 13 Médias mensuradas para espermatozóides vivos (%) e resistência osmótica (%) em diferentes períodos de incubação (37 °C) após a adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de Incubação (minutos)            | IGF-I (ng/mL) <sup>1</sup> |      |        |        | Média  |
|---|----------------------------|------|--------|--------|--------|
|   | 0                          | 50   | 100    | 150    |        |
| <i>- Espermatozóides vivos -</i>        |                            |      |        |        |        |
| 0                                       | 24,2                       | 21,4 | 23,6   | 26,8   | 24,0 a |
| 120                                     | 20,8                       | 17,4 | 16,4   | 20,8   | 18,9 b |
| Média <sup>3</sup>                      | 22,5                       | 19,4 | 20,0   | 23,8   |        |
| CV (%)                                  | 10,2                       |      |        |        |        |
| <i>- Taxa de Resistência Osmótica -</i> |                            |      |        |        |        |
| 0                                       | 80,8                       | 84,0 | 71,5 b | 77,6 a | 78,5   |
| 120 <sup>2</sup>                        | 83,2                       | 80,6 | 80,0 a | 69,2 b | 78,3   |
| Média                                   | 82,0                       | 82,3 | 75,8   | 73,4   |        |
| CV (%)                                  | 4,4                        |      |        |        |        |

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P<0,05$ )

<sup>2</sup>Regressão linear significativa ( $P<0,05$ )

<sup>3</sup>Regressão quadrática significativa ( $P<0,05$ )

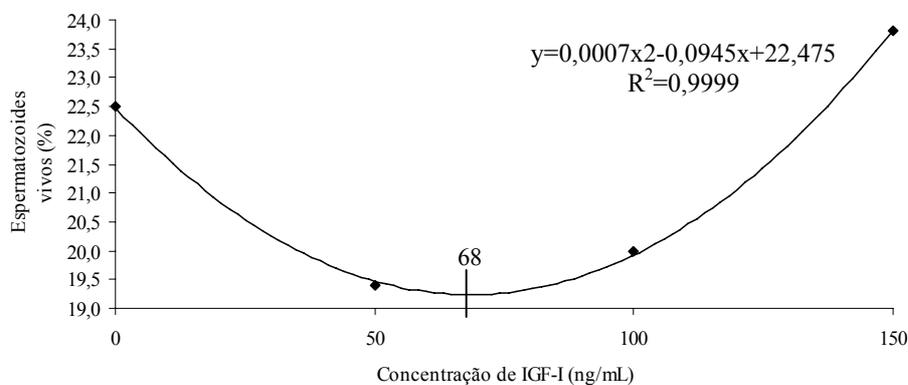


Figura 6. Teste de vivos e mortos após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado

Também se pode observar que, aos 120 minutos de incubação, houve redução linear ( $P<0,05$ ), da taxa de resistência osmótica com o aumento da concentração de IGF-I. A ocorrência de choque osmótico eventualmente resulta em redução da viabilidade espermática (COOREA et al., 1996; CORREA; ZAVOS, 1995), porém esse fato não foi verificado na pesquisa em questão.

Houve aumento da resistência osmótica com o passar do tempo quando se adicionou 100 ng/mL de IGF-I e redução da resistência ao adicionar 150 ng/mL. Alguns estudos demonstraram que espermatozoides criopreservados são particularmente sensíveis às mudanças nas condições osmóticas encontradas durante o congelamento, descongelamento e processamento (FISER; FAIRFULL, 1984; FOOTE, 1978; ZAVOS, 1991).

Na Tabela 14, estão apresentados os resultados obtidos para a quantidade de anormalidades de cabeça (pequena, grande, isolada, piriforme e alterações no acrossoma), de cauda (enrolada, enovelada, quebrada, isolada e presença de gota citoplasmática proximal) e o total de anormalidades morfológicas no sêmen descongelado.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) em relação aos períodos de incubação ou às concentrações de IGF-I sobre os parâmetros morfológicos do sêmen descongelado. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Selvaraju et al. (2009), em que não foi encontrada diferença estatística na integridade acrossômica de espermatozoides incubados com 100 ng/mL de IGF-I quando comparado ao grupo controle (sem adição de hormônio). Porém, Glander et al. (1996) afirmaram que o IGF-I é necessário para o desenvolvimento de células germinativas humanas e que o IGF-I seminal é associado com morfologia normal.

Tabela 14 Anormalidades na morfologia espermática (%) em diferentes períodos de incubação (37 °C) após a adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)       | IGF-I (ng/mL) |      |      |      | Média | P=     |
|------------------------------------|---------------|------|------|------|-------|--------|
|                                    | 0             | 50   | 100  | 150  |       |        |
| <i>- Anormalidades de cabeça -</i> |               |      |      |      |       |        |
| 0                                  | 15,7          | 10,7 | 13,7 | 13,2 | 13,3  | 0,1072 |
| 120                                | 14,7          | 16,3 | 13,5 | 14,2 | 14,7  |        |
| Média                              | 15,2          | 13,5 | 13,6 | 13,7 |       |        |
| <i>- Anormalidades de cauda -</i>  |               |      |      |      |       |        |
| 0                                  | 9,7           | 9,7  | 11,3 | 8,7  | 9,8   | 0,7690 |
| 120                                | 7,7           | 9,5  | 11,0 | 10,0 | 9,5   |        |
| Média                              | 8,7           | 9,6  | 11,2 | 9,3  |       |        |
| <i>- Total de anormalidades -</i>  |               |      |      |      |       |        |
| 0                                  | 29,7          | 22,3 | 26,3 | 25,2 | 25,9  | 0,4295 |
| 120                                | 25,2          | 26,8 | 25,2 | 24,8 | 25,5  |        |
| Média                              | 27,4          | 24,6 | 25,8 | 25,0 |       |        |

<sup>1</sup>Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ )

Os resultados obtidos para peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides e atividade da enzima glutatona peroxidase estão na Tabela 15.

Após o desdobramento da interação, observou-se redução linear ( $P < 0,05$ ) aos 120 minutos de incubação para a peroxidação lipídica com o aumento de IGF-I. Também se pode observar que houve aumento linear ( $P < 0,05$ ) para a atividade da glutathiona peroxidase com o aumento da concentração do hormônio. Um sistema antioxidante composto por glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase tem sido descrito como um mecanismo de defesa contra a peroxidação lipídica do sêmen e isso é importante para a manutenção da motilidade e da viabilidade espermática (Bucak et al., 2010).

Tabela 15 Peroxidação lipídica ( $\mu\text{Mol}$  equivalente) e atividade da glutathiona peroxidase (unidades/mL) em diferentes períodos de incubação ( $37^\circ\text{C}$ ) após a adição de IGF-I ao sêmen suíno descongelado – Brasil – 2010 (n=7).

| Tempo de incubação (minutos)                   | Dose de IGF-I (ng/mL) <sup>1</sup> |      |      |      | Média |
|--|------------------------------------|------|------|------|-------|
|  | 0                                  | 50   | 100  | 150  |       |
| <i>- Peroxidação lipídica -</i>                |                                    |      |      |      |       |
| 0  | 2,91                               | 2,94 | 2,89 | 3,12 | 2,96  |
| 120 <sup>1</sup>                               | 3,37                               | 2,71 | 2,69 | 2,60 | 2,84  |
| Média  | 3,14                               | 2,82 | 2,74 | 2,90 |       |
| CV (%)   | 7,25                               |      |      |      |       |
| <i>- Atividade da Glutathiona Peroxidase -</i> |                                    |      |      |      |       |
| 0  | 3,23                               | 3,11 | 3,03 | 3,42 | 3,20  |
| 120 <sup>1</sup>                               | 2,80                               | 3,23 | 3,59 | 4,05 | 3,42  |
| Média  | 3,01                               | 3,17 | 3,54 | 3,50 |       |
| CV (%)   | 11,87                              |      |      |      |       |

<sup>1</sup>Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

Selvaraju et al. (2009) encontraram correlação negativa ( $r = -0,96$ ) entre os níveis de peroxidação lipídica e a motilidade espermática. No presente estudo, pode-se observar que a adição de IGF-I melhorou a motilidade

espermática enquanto diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade da glutathione peroxidase. Bell et al. (1993) também encontraram correlação negativa entre peroxidação lipídica e motilidade espermática.

Na Tabela 16, são encontrados os resultados obtidos para o consumo de frutose pelos espermatozoides.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para o consumo de frutose pelos espermatozoides submetidos a diferentes concentrações de IGF-I. Esse resultado foi diferente do encontrado por Selvaraju et al. (2009), que adicionaram 100 ng/mL de IGF-I ao sêmen descongelado de búfalos e observaram aumento no consumo desse carboidrato pelos espermatozoides aos 30 e 60 minutos de incubação. Através disso, explicaram o aumento da motilidade espermática nos mesmos períodos de incubação.

Tabela 16 Consumo de frutose pelos espermatozoides (mmol/L) após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado – Brasil – 2010 (n=7).

| Variável           | Dose de IGF-I (ng/mL) <sup>1</sup> |      |      |      | Média | CV (%) | P=     |
|--------------------|------------------------------------|------|------|------|-------|--------|--------|
|                    | 0                                  | 50   | 100  | 150  |       |        |        |
| Consumo de frutose | 8,48                               | 7,27 | 6,08 | 6,54 | 7,09  | 23,04  | 0,4867 |

<sup>1</sup>Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ )

## 5 CONCLUSÃO

Varrões de diferentes linhagens apresentam média de 1,5 ng/mL de IGF-I no plasma seminal *in natura*, estando associada de forma indireta apenas com o teste de vivos e mortos.

A adição de 100 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno resfriado e de 150 ng/mL ao sêmen descongelado proporciona melhoria nos parâmetros seminais.

**REFERÊNCIAS**

AITKEN, R. J. Pathophysiology of human spermatozoa. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, London, v. 6, n. 2, p. 128-135, Apr. 1994.

ALVARENGA, A. L. N.; MURGAS, L. D. S.; ZANGERONIMO, M. G. Types and volumes of diluents for intrauterine artificial insemination in swine. **Brazilian Journal of Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.10, p. 1886-1892, Oct. 2009.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, New York, v. 23, n. 1, p. 77-90, May 1989.

ANIL, S. S. et al. A retrospective study on the preservation capacity of a commercial boar semen extender. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, n. 3/4, p. 425-436, Aug. 2004.

BARTKE, A. Effects of growth hormone on male reproductive functions. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 2, p. 181-188, Mar./Apr. 2000.

BAUER, A.; LACORN, M.; CLAUS, R. Effects of two levels of feed allocation on IGF-I concentrations and metabolic parameters in GnRH-immunized boars. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 93, n. 6, p. 744-753, Dec. 2009.

BELL, M. et al. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 14, n. 6, p. 472-478, Nov./Dec. 1993.

BIEDERMANN, G.; RUPP, G. Influence of the method of mating on the performance of reproduction of sows. **Zuchungskunde**, Stuttgart, v. 67, n. 1, p. 25-30, Jan./Feb. 1995.

BOLARIN, A. et al. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 3, p. 669-80, Feb. 2006.

BORTOLOZZO, F. P. et al. **Suinocultura em ação**: inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Pallotti, 2005. 185 p.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1/3, p. 17-32, 2005.

BRAND, H. et al. Effect of postweaning dietary energy source on reproductive traits in primiparous sows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 420-426, Feb. 2001.

BREIER, B. H. et al. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. **Endocrinology**, Oxford, v. 137, n. 9, p. 4061-4064, Sept. 1996.

BREIER, B. H. et al. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? **Endocrine Journal**, Toquio, v. 45, suppl., p. 53-60, Apr. 1998.

BRITO, L. F. C. et al. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 33, n. 1, p. 1-18, July 2007.

BUCAK, M. N. et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 24-30, Mar. 2010.

CEROLINI, S. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 3, p. 395-401, Mar. 2001.

CHAMPION, Z. J. et al. Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa *in vitro*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 8, p. 1793-1800, May 2002.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, n. 4, p. 451-458, Aug. 2001.

CÓRDOVA, A. I.; PÉREZ, J. F. G.; MARTÍN, R. S. Fases previa y postcongelación del sêmen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides. **Universidad y Ciencia**, Tabasco, v. 20, n. 40, p. 61-68, dic. 2004.

CÓRDOVA, A. I.; PÉREZ, J. F. G.; MARTÍN, R. S. Temperatura de descongelación del semen de verraco capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides congelados en pajillas de 5 ml. **Visión Técnica**, v. 4, n. 5, p. 32-35, 2000.

CORREA, J. R. et al. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, n. 3, p. 413-420, Aug. 1996.

CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted via slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, n. 7, p. 963-971, Nov. 1995.

CORRÊA, M. N. et al. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: UFPEL, 2001. 181 p.

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 46-52, Jan. 2000.

ECHEGARAY, A. ¿Para cuándo el semen de porcino congelado?. **Revista Computadorizada de Producción Porcina**, Havana, v. 17, n. 48, p. 3-5, 2003.

FAUSTINI, M. et al. Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18 8C. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 1, p. 173-184, Jan. 2004.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**, San Diego, v. 21, n. 5, p. 542-551, Oct. 1984.

FITZGERALD, F. R.; JONES, G. F.; STALDER, K. J. Effects of intrauterine and cervical artificial-insemination catheters on farrowing rate and litter size. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 16, n. 1, p. 10-15, Jan./Feb. 2008.

FLOWERS, W. L.; ALHUSEN, H. D. Reproductive-performance and estimates of labor requirements associated with combinations of artificial-insemination and natural service in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 615-621, Mar. 1992.

FLOWERS, W. L. Sêmen evaluation, extension, packaging and transportation methods. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996, Nashville. **Proceedings...** Nashville: AASP, 1996. p. 469-479.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT Statistical databases 2009**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=nutrition>>. Acesso em: 28 jul. 2009.

FOOTE, R. H. Freezing bull spermatozoa: a review. **Cryobiology**, San Diego, v. 15, n. 3, p. 350-351, June 1978.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M. A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 5, p. 303-308, Oct. 2004.

GANCARCZYK, M. et al. Aromatization and antioxidant capacity in the testis of seasonally breeding bank voles: effects of LH, PRL and IGF-I. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 7, p. 1376-1391, Apr. 2006.

GLANDER, H. J. et al. Insulin-like growth factor-I and 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 2454-2460, Sept. 1996.

GRAVANCE, C. G. et al. Impaired semen characteristics in post pubertal growth hormone deficient dwarf (*dw/dw*) rats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 71-76, Sept. 1997.

HENRICKS, D. M. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 330-337, Aug. 1998.

HESS, M. F.; ROSER, J. F. The effects of age and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor-I concentration in stallions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, n. 5, p. 723-733, Sept. 2001.

HOSSENLOPP, P. et al. M. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding sites. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 154, n. 1, p. 138-143, Apr. 1986.

HUO, L. J. et al. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 7, p. 1349-1360, Oct. 2002.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 219-228, Jan. 1984.

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

KAMANGA-SOLLO, E. et al. IGF-I mRNA levels in bovine satellite cell cultures: effects of fusion and anabolic steroid treatment. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 201, n. 2, p. 181-189, Nov. 2004.

KOBAYASHI, T. et al. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 987-991, Aug. 1991.

LEIDL, W. et al. Analysis of sperm motility by computer assisted methods, with special consideration of *in vitro* fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 36, n. 2, p. 222-228, Oct. 1993.

LIMA, F. P. et al. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermiática e atividade da aspartato amino transferase no sêmen resfriado de suíno. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1506-1511, set./out. 2007.

LIMA, J. A. F.; OLIVEIRA, A. I. G.; FIALHO, E. T. **Produção de suínos**. Lavras: UFLA, 2004. 199 p.

LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 12, n. 4, p. 231-239, July/Aug. 1991.

LU, J. C. et al. Standardization and quality control for determination of fructose in seminal plasma. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 28, n. 2, p. 207-213, Mar./Apr. 2007.

MACPHERSON, M. L. et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and-5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 2, p. 648-654, Aug. 2002.

MARTÍN, R. S. Perspectivas de la inseminación artificial porcina. **Porcicultura**, v. 7, n. 13, p. 23-24, 2000.

MATEOS, J. G. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.

MIAO, Z. R. et al. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on *in vitro* sperm motility. **Clinical Endocrinology**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 235-239, Sept. 1998.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1982. v. 5, 380 p.

MILLER, J. et al. Sperm concentration the intrauterine artificial insemination n swine. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 6, p. 1671-1674, nov./dez. 2009.

MINELLI, A. et al. Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology: Part A: Ecological Genetics and Physiology**, Hoboken, v. 290, n. 3, p. 311-317, Aug. 2001.

MINELLI, A.; MORONI, M.; CASTELLINI, C. Isolation and purification of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: Effects on sperm motility and viability. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, Hoboken, v. 290, n. 3, p. 279-290, Aug. 2001.

MURGAS, L. D. S. et al. Crioconservação espermiática en la espécie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospermico. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001. 1 CD-ROM.

MURGAS, L. D. S. et al. Oxitocina no sêmen suíno heterospermico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 33-40, jul./dez. 2002.

NAZ, R. K.; PADMAN, P. Identification of insulin-like growth factor (IGF)-I receptor in human sperm cells. **Archives of Andrology**, New York, v. 43, n. 2, p. 153-159, Sept. 1999.

NEILD, D. M. et al. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 1, p. 295-298, Jan. 2002.

OVESEN, P. et al. GH treatment of subfertile males. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 66, n. 2, p. 292-298, Mar. 1996.

PALLAS, R.; DE ALBA, C. Impacto de las nuevas tecnologías de inseminación artificial en la gestión de un centro de inseminación artificial.

**Computadorizada de Producción Porcina**, Havana, v. 16, n. 46, p. 15-16, 2002.

PETRUNKINA, A. M. et al. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 6, p. 889-896, June 2001.

POTO, A. et al. Congelación de semen porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. **Archivos de Zootecnia**, Corboda, v. 49, n. 188, p. 493-496, dic. 2000.

QUETGLAS, M. D. et al. Effect of insulin-like growth factor-1 during in vitro oocyte maturation and in vitro culture of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 207-211, abr. 2001.

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 4, p. 673-690, Feb. 2004.

ROA, N. et al. Criopreservación de semen suino en Venezuela: una revisión. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, Málaga, v. 6, n. 5, p. 504-508, mayo 2005.

ROBERTS, N. E.; ALMOND, G. W. Infection of growing swine with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: effects on growth, serum metabolites, and insulin-like growth factor-I. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 44, n. 1, p. 31-37, Jan. 2003.

ROCA, J. et al. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 1, p. 43-53, Feb. 2006.

RODRIGUEZ-MATINEZ, H. et al. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 514-535, Jan. 2005.

ROSENDAL, L et al. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 93, n. 5, p. 1669-1675, Nov. 2002.

ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science** Amsterdam, v. 68, n. 3/4, p. 139-151, Feb. 2001.

SALGUEIRO, C. C. M. et al. Utilization of different extenders and methods for the freezing of Murciano- Granadina buck semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 4, p.625-630, out./dez. 2003.

SANTOS, A. D. F. et al. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 3, p.438-439, 2001.

SCHEID, I. R. **Manual de inseminação artificial de suínos**: procedimentos e métodos no laboratório. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 1993. 48 p.

SELVARAJU, S. et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1/4, p. 60-70, July 2009.

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Early pregnancy maternal endocrine insulin-like growth factor I programs the placenta for increased functional capacity throughout gestation. **Endocrinology**, Oxford, v. 148, n. 9, p. 4362-4370, Sept. 2007.

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Maternal insulin-like growth factors-I and -II act via different pathways to promote fetal growth. **Endocrinology**, Oxford, v. 147, n. 7, p. 3344-3355, July 2006.

SMITH, T. T. The Modulation of sperm function by oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, n. 5, p. 1102-1104, May 1998.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Sas User's Guide**: statistics version 6. 4. ed. Cary, NC, 1996. v. 2, 400 p.

STEVENSON, K. R.; WATHES, E. D. C. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 31-40, Sept. 1996.

STEWART, R. E. et al. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology**, Bethesda, v. 137, n. 7, p. 2842-2850, July 1996.

SUAREZ, S. S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, n. 5, p. 1105-1107, May 1998.

TAVAKKOL, A.; SIMMEN, F. A.; SIMMEN, R. C. Porcine insulin-like growth factor-I (pIGF-I): Complementary deoxyribonucleic acid cloning and uterine expression of messenger ribonucleic acid cloning evolutionarily conserved IGF-I peptides. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 2, n. 2, p. 674-681, Aug. 1988.

UCHOA, D. C. et al. Conservação do sêmen canino a 37°C em diluentes à base de água de coco. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 91-95, fev. 2002.

VASCONCELOS, A. M. M. A. et al. Spermatic characteristics of cooled and conserved swine semen in different diluents. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 2, p. 394-401, mar./abr. 2001.

VICKERS, M. H. et al. IGF-I treatment increases motility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat. **Growth Hormone & IGF Research**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 236-240, Aug. 1999.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 23-53, Aug. 2000.

ZACZEK, D. et al. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 4, p. 1115-1124, Oct. 2002.

ZAVOS, P. M. Principles of cryopreservation of frozen-thawed human spermatozoa: state-of-the-art. **Infertility**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 239-246, 1991.

ZULU, V. C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutrition regulation of reproduction in cattle. **Journal Veterinary Medical Science**, Seoul, v. 64, n. 8, p. 657-665, 2002.

WAINER, R. et al. Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm. **Contraception Fertility Sexuality**, Bethesda, v. 24, n. 12, p. 897-903, Dec. 1996.

WATHES, D. C. et al. Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 6, p. 1778-1789, July 1998.

WENTZ, I. et al. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 3., 2000, Flores da Cunha. **Anais...** Flores da Cunha: SINSUI, 2000. p. 5-12.

WESTENDORF, P. et al. Zur tiefgefrierung von bbersperma: labor - und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 82, p. 261-267, 1975.

## ANEXOS

TABELA 1A Análise de variância para motilidade espermática em diferentes tempos de armazenamento e de incubação no sêmen suíno adicionado de IGF-I.

| FV            | GL | SQ     | QM     | F     | P>F    |
|---------------|----|--------|--------|-------|--------|
| Animal        | 6  | 74,12  | 12,35  | 4,66  | 0,0005 |
| IGF-I         | 3  | 8,26   | 2,75   | 1,04  | 0,3813 |
| Armazenamento | 2  | 84,46  | 42,23  | 15,93 | 0,0000 |
| IGF*Arm.      | 6  | 16,41  | 2,73   | 1,03  | 0,4130 |
| Erro 1        | 1  | 66,00  | 175,01 | 2,65  |        |
| Incubação     | 4  | 147,73 | 36,93  | 39,44 | 0,0000 |
| IGF*Incub.    | 12 | 10,26  | 0,86   | 0,91  | 0,5342 |
| Arm.*Incub.   | 8  | 20,58  | 2,57   | 2,75  | 0,0062 |
| IGF*A.*I.     | 24 | 17,05  | 0,71   | 0,76  | 0,7870 |
| Erro 2        | 2  | 288,00 | 269,72 | 0,94  |        |

TABELA 2A Análise de variância para teste de vivos e mortos em diferentes tempos de armazenamento e de incubação no sêmen suíno adicionado de IGF-I.

| FV            | GL | SQ      | QM     | F     | P>F    |
|---------------|----|---------|--------|-------|--------|
| Animal        | 6  | 548,98  | 91,50  | 5,51  | 0,0001 |
| IGF-I         | 3  | 44,33   | 14,78  | 0,89  | 0,4508 |
| Armazenamento | 2  | 125,512 | 62,76  | 3,78  | 0,0279 |
| IGF*Arm.      | 6  | 57,35   | 9,56   | 0,58  | 0,7481 |
| Erro 1        | 66 | 1095,31 | 16,60  |       |        |
| Incubação     | 1  | 152,38  | 152,38 | 10,40 | 0,0019 |
| IGF*Incub.    | 3  | 100,62  | 33,54  | 2,29  | 0,0856 |
| Arm.*Incub.   | 2  | 48,01   | 24,01  | 1,64  | 0,2014 |
| IGF*A.*I.     | 6  | 155,13  | 25,86  | 1,77  | 0,1186 |
| Erro 2        | 72 | 1054,86 | 14,65  |       |        |

TABELA 3A Análise de variância para resistência osmótica dos espermatozoides em diferentes tempos de armazenamento e de incubação no sêmen suíno adicionado de IGF-I.

| FV            | GL | SQ     | QM    | F     | P>F    |
|---------------|----|--------|-------|-------|--------|
| Animal        | 6  | 472,92 | 78,82 | 11,63 | 0,0000 |
| IGF-I         | 3  | 21,64  | 7,21  | 1,07  | 0,3702 |
| Armazenamento | 2  | 3,58   | 1,79  | 0,26  | 0,7685 |
| IGF*Arm.      | 6  | 109,46 | 18,24 | 2,69  | 0,0212 |
| Erro 1        | 66 | 447,23 | 6,78  |       |        |
| Incubação     | 1  | 8,60   | 8,60  | 0,76  | 0,3863 |
| IGF*Incub.    | 3  | 66,69  | 22,23 | 1,97  | 0,1268 |
| Arm.*Incub.   | 2  | 5,73   | 2,86  | 0,25  | 0,7771 |
| IGF*A.*I.     | 6  | 34,56  | 5,76  | 0,51  | 0,7995 |
| Erro 2        | 72 | 814,43 | 11,31 |       |        |

TABELA 4A Análise de variância para peroxidação lipídica da membrana dos espermatozoides em diferentes tempos de armazenamento e de incubação no sêmen suíno adicionado de IGF-I.

| FV            | GL | SQ     | QM    | GL   | P>F    |
|---------------|----|--------|-------|------|--------|
| Animal        | 6  | 25,07  | 4,18  | 0,43 | 0,8566 |
| IGF-I         | 3  | 47,22  | 15,74 | 1,62 | 0,1934 |
| Armazenamento | 2  | 91,78  | 45,89 | 4,72 | 0,0122 |
| IGF*Arm.      | 6  | 107,01 | 17,83 | 1,83 | 0,1059 |
| Erro 1        | 66 | 641,87 | 9,73  |      |        |
| Incubação     | 1  | 5,62   | 5,62  | 1,07 | 0,3043 |
| IGF*Incub.    | 3  | 113,08 | 37,69 | 7,17 | 0,0003 |
| Arm.*Incub.   | 2  | 25,94  | 12,97 | 2,47 | 0,0918 |
| IGF*A.*I.     | 6  | 105,16 | 17,53 | 3,34 | 0,0059 |
| Erro 2        | 72 | 378,30 | 5,25  |      |        |

TABELA 5A Análise de variância para atividade da glutatona peroxidase em diferentes tempos de armazenamento e de incubação no sêmen suíno adicionado de IGF-I.

| FV            | GL | SQ   | QM   | GL    | P>F    |
|---------------|----|------|------|-------|--------|
| Animal        | 6  | 2,20 | 0,37 | 4,67  | 0,0005 |
| IGF-I         | 3  | 1,54 | 0,51 | 6,52  | 0,0006 |
| Armazenamento | 2  | 0,60 | 0,30 | 3,80  | 0,0275 |
| IGF*Arm.      | 6  | 2,98 | 0,50 | 6,31  | 0,0000 |
| Erro 1        | 66 | 5,19 | 0,08 |       |        |
| Incubação     | 1  | 0,87 | 0,87 | 10,08 | 0,0022 |
| IGF*Incub.    | 3  | 1,40 | 0,47 | 5,42  | 0,0020 |
| Arm.*Incub.   | 2  | 0,61 | 0,30 | 3,53  | 0,0345 |
| IGF*A.*I.     | 6  | 4,96 | 0,83 | 9,59  | 0,0000 |
| Erro 2        | 72 | 6,21 | 0,09 |       |        |

TABELA 6A Análise de variância para consumo de frutose pelos espermatozoides em diferentes tempos de armazenamento no sêmen suíno adicionado de IGF-I.

| FV            | GL | SQ      | QM     | F    | P>F    |
|---------------|----|---------|--------|------|--------|
| Animal        | 6  | 80,15   | 13,36  | 0,73 | 0,6270 |
| IGF-I         | 3  | 152,43  | 50,81  | 2,78 | 0,0480 |
| Linear        | 1  | 132,78  | 132,78 | 7,26 | 0,0090 |
| Quadrático    | 1  | 12,97   | 12,97  | 0,71 | 0,4030 |
| Armazenamento | 2  | 3,38    | 1,69   | 0,09 | 0,9119 |
| IGF*Arm.      | 6  | 201,32  | 33,55  | 1,83 | 0,1059 |
| Erro          | 66 | 1207,63 | 18,30  |      |        |

TABELA 7A Análise de variância para teste de vivos e mortos em diferentes períodos de incubação após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado.

| FV         | GL | SQ   | QM    | F     | P>F    |
|------------|----|------|-------|-------|--------|
| Animal     | 5  | 1,36 | 0,27  | 1,96  | 0,1445 |
| IGF        | 3  | 1,93 | 0,64  | 4,64  | 0,0173 |
| Linear     | 1  | 0,09 | 0,092 | 0,67  | 0,4280 |
| Quadrático | 1  | 1,84 | 1,84  | 13,26 | 0,0020 |
| Erro 1     | 15 | 2,08 | 0,14  |       |        |
| Incubação  | 1  | 4,00 | 4,00  | 18,17 | 0,0004 |
| IGF*Incub. | 3  | 0,45 | 0,15  | 0,69  | 0,5719 |
| Erro 2     | 20 | 4,40 | 0,22  |       |        |

TABELA 8A Análise de variância para resistência osmótica dos espermatozoides em diferentes períodos de incubação após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado.

| FV                | GL | SQ   | QM   | F     | P>F    |
|-------------------|----|------|------|-------|--------|
| Animal            | 5  | 5,32 | 1,06 | 5,45  | 0,0047 |
| IGF-I             | 3  | 1,90 | 0,63 | 3,24  | 0,0518 |
| Erro 1            | 15 | 2,93 | 0,20 |       |        |
| Incubação         | 1  | 0,08 | 0,08 | 0,53  | 0,4743 |
| IGF*Incub.        | 3  | 2,02 | 0,67 | 4,53  | 0,0140 |
| Incub. d. IGF 0   | 1  | 0,06 | 0,06 | 0,37  | 0,5496 |
| Incub. d. IGF 50  | 1  | 0,54 | 0,54 | 3,65  | 0,0706 |
| Incub. d. IGF 100 | 1  | 0,70 | 0,70 | 4,70  | 0,0425 |
| Incub. d. IGF 150 | 1  | 0,80 | 0,80 | 5,41  | 0,0307 |
| IGF d. Incub. 0   | 3  | 1,63 | 0,54 | 3,66  | 0,0293 |
| Linear            | 1  | 0,45 | 0,45 | 3,06  | 0,0960 |
| Quadrático        | 1  | 0,04 | 0,04 | 0,27  | 0,6100 |
| IGF d. Incub. 120 | 3  | 2,29 | 0,76 | 5,14  | 0,0083 |
| Linear            | 1  | 1,56 | 1,56 | 10,52 | 0,0040 |
| Quadrático        | 1  | 0,11 | 0,11 | 0,77  | 0,3910 |
| Erro 2            | 20 | 2,97 | 0,15 |       |        |

TABELA 9A Análise de variância para peroxidação lipídica da membrana dos espermatozoides em diferentes períodos de incubação após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado.

| FV                | GL | SQ   | QM   | GL   | P>F    |
|-------------------|----|------|------|------|--------|
| Animal            | 5  | 0,03 | 0,01 | 0,44 | 0,8153 |
| IFG-I             | 3  | 0,08 | 0,03 | 1,80 | 0,1919 |
| Erro 1            | 15 | 0,22 | 0,01 |      |        |
| Incubação         | 1  | 0,02 | 0,02 | 1,17 | 0,2924 |
| IGF*Incub.        | 3  | 0,11 | 0,04 | 2,34 | 0,1037 |
| Incub. d. IGF 0   | 1  | 0,04 | 0,04 | 2,93 | 0,1025 |
| Incub. d. IGF 50  | 1  | 0,01 | 0,01 | 0,91 | 0,3512 |
| Incub. d. IGF 100 | 1  | 0,02 | 0,02 | 1,53 | 0,2306 |
| Incub. d. IGF 150 | 1  | 0,04 | 0,04 | 2,83 | 0,1080 |
| IGF d. incub.0    | 3  | 0,01 | 0,01 | 0,32 | 0,8130 |
| IGF d. incub 120  | 3  | 0,17 | 0,06 | 3,79 | 0,0260 |
| Linear            | 1  | 0,10 | 0,10 | 6,83 | 0,0170 |
| Quadrático        | 1  | 0,07 | 0,07 | 4,41 | 0,0490 |
| Erro 2            | 20 | 0,30 | 0,02 |      |        |

TABELA 10A Análise de variância para atividade da glutatona peroxidase em diferentes períodos de incubação após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado.

| FV                | GL | SQ    | QM   | GL   | P>F    |
|-------------------|----|-------|------|------|--------|
| Animal            | 5  | 0,19  | 0,04 | 1,07 | 0,4170 |
| IFG-I             | 3  | 0,17  | 0,06 | 1,60 | 0,2322 |
| Erro 1            | 15 | 0,53  | 0,04 |      |        |
| Incubação         | 1  | 0,049 | 0,05 | 1,06 | 0,3159 |
| IGF*Incub.        | 3  | 0,23  | 0,08 | 1,65 | 0,2092 |
| Incub. d. IGF 0   | 1  | 0,04  | 0,04 | 0,85 | 0,3664 |
| Incub. d. IGF 50  | 1  | 0,01  | 0,01 | 0,12 | 0,7371 |
| Incub. d. IGF 100 | 1  | 0,22  | 0,22 | 4,85 | 0,0395 |
| Incub. d. IGF 150 | 1  | 0,01  | 0,01 | 0,19 | 0,6658 |
| IGF d. incub.0    | 3  | 0,03  | 0,01 | 0,24 | 0,8639 |
| IGF d. incub 120  | 3  | 0,36  | 0,12 | 2,63 | 0,0773 |
| Linear            | 1  | 0,22  | 0,22 | 4,83 | 0,0400 |
| Quadrático        | 1  | 0,09  | 0,09 | 1,97 | 0,1750 |
| Erro 2            | 20 | 0,92  | 0,05 |      |        |

TABELA 11A Análise de variância para consumo de frutose pelos espermatozoides após a adição de IGF-I no sêmen suíno descongelado.

| FV     | GL | SQ     | QM   | F    | P>F    |
|--------|----|--------|------|------|--------|
| Animal | 5  | 36,52  | 7,30 | 0,80 | 0,5667 |
| IGF-I  | 3  | 19,70  | 6,56 | 0,72 | 0,5560 |
| Erro   | 15 | 136,94 | 9,13 |      |        |