

USO DE DILUENTES ALTERNATIVOS E DO ÁCIDO FÍTICO ADICIONADO AO SÊMEN SUÍNO CONSERVADO

(Use of alternative extenders and the phytic acid added to stored boar semen)

Aline Viana DIAS^{1*}; Daianny Barboza GUIMARÃES²; Lina Raquel Santos ARAÚJO¹;
Ludymila Furtado CANTANHÊDE¹; Tatyane Bandeira BARROS¹; Ricardo TONIOLLI²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV-UECE),
Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: 60.740-000; ²Laboratório de
Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (UECE). *E-mail: alinedias.vet@hotmail.com

RESUMO

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

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

ABSTRACT

Antioxidants are used for the preservation of semen from several domestic species. Diante disso, the present study aimed to determine the best diluent for adding different concentrations of phytic acid and verify the effects on boar sperm kept. In the step I, 60 ejaculated and three extenders were used: BTS; LPD and ACP-103[®]. In the step II, the BTS as best diluent of step I, has received three concentrations of phytic acid: (T1) BTS (control); BTS + 175mM of phytic acid (T2); BTS + 350mM (T3) and BTS + 525mM (T4). Daily analyzes of vigour and motility were performed, and in D0 and D4 hyposmotic and vitality and acrosomal integrity. The T4 on sperm motility was higher (p<0.05) compared to T1. Regarding the percentage of live sperm, no significant difference was found in any of the treatments tested, however, in the case of membrane integrity, T4 in D0 and D4 achieved significantly better results (p<0.05) in comparison with T1. The addition of phytic acid in BTS promoted positive effects in some analyzes, but more studies must be conducted to elucidate the effects of phytic acid on sperm metabolism.

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

INTRODUÇÃO

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

Numerosos trabalhos têm sido efetuados com a finalidade de se desenvolver um diluente para o sêmen de diferentes reprodutores domésticos. Meios diluentes alternativos como o leite desnatado (MEIRELES *et al.*, 1998; TONIOLLI *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2015) e a água de coco (NUNES e SALGUEIRO, 1999; CARDOSO *et al.*, 2002; TONIOLLI *et al.*, 2010), vem sendo utilizados na conservação do sêmen de diversas espécies domésticas, e prometem uma boa qualidade espermática ao final do período de conservação a baixos custos. Paralelamente, o uso de várias substâncias adicionadas aos diluentes tem sido uma prática corriqueira, podendo ser citados antioxidantes (JEONG *et al.*, 2009), crioprotetores e aminoácidos (LINDEBERG *et al.*, 1999; FAGUNDES *et al.*, 2010).

Segundo Stryer (1996), uma das razões que explicam a diminuição da qualidade do ejaculado de um reprodutor após um período de conservação, é a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres. Os antioxidantes, poderosos inibidores de radicais livres, diminuindo ou suprimindo a formação de EROS, bem como suas ações lesivas às células. A adição dos antioxidantes aos diluentes de sêmen, tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide dos efeitos tóxicos das EROs (MAIA, 2006).

O ácido fítico (AF) presente em grandes concentrações no farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), é visto como um potente antioxidante natural, capaz de inibir a formação de radicais livres ao ser veiculado nas rações BOHN *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Pacheco (PACHECO, 2012), carnes originadas de animais que receberam dietas de rações com FGMD, apresentaram menores índices de oxidação, em comparação às dietas sem esta inclusão, fato este, que sugere ser eficiente o efeito antioxidante do ácido fítico. Diante destes resultados, pode-se sugerir que o AF, inibiu a capacidade de formação de radicais hidroxil, diminuindo desta forma a peroxidação lipídica (GRAF e EATON, 1990). Por essa razão, o AF é indicado como um antioxidante ideal para a carne suína, porém, ainda não existem trabalhos com a adição do AF no diluente do sêmen a fim de se verificar a influência do mesmo sobre a qualidade espermática. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de diluentes alternativos de sêmen, bem como verificar a ação do ácido fítico em diferentes concentrações sobre a qualidade do sêmen conservado do varrão.

MATERIAL E MÉTODOS

Reprodutores, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

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

O sêmen de cinco reprodutores foi coletado uma vez por semana, durante 12 semanas (n=60). A coleta foi realizada pela técnica da mão enluvada em recipiente coberto por filtro e protegido por copo térmico. Foi aproveitado o ejaculado total após a separação da parte gelatinosa (HANCOCK e HOVELL, 1959). Foram utilizados animais com idades variáveis entre 12 e 24 meses, provenientes do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen da FAVET/UECE. A qualidade do ejaculado *in natura* foi avaliada pelas características: concentração ($\times 10^6$ spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5; TONIOLLI, 1996) e total células móveis (0 a 100%; MARTIN RILLO *et al.*, 1996). Só foram aproveitados os ejaculados que apresentassem valores de $\geq 3,0$ para o vigor e $\geq 80\%$ de espermatozoides móveis.

Manejo nutricional dos reprodutores

Os reprodutores são alimentados com ração de boa qualidade, com os níveis proteicos, energéticos e minerais dentro dos padrões estipulados para a fase de reprodução (3.150 Kcal de energia metabolizável e 14% de PB). O consumo diário por reprodutor será de 2,5 Kg/dia, em dois arraçoamentos. Água potável será fornecida ad libitum.

Etapas, diluição e conservação do sêmen

O trabalho foi dividido em duas etapas experimentais. Na etapa I foram testados os diluentes alternativos, água de coco em pó (ACP[®]-103) e leite em pó desnatado (LPD). Na etapa II foram testadas três diferentes concentrações do antioxidante ácido fítico (AF).

Independentemente da etapa em questão, o sêmen sempre foi trabalhado à uma concentração fixa de 35×10^6 spz/mL, com um volume final por tratamento de 12,5 mL (sêmen + diluente), envazados em cinco tubos de ensaio/tratamento (2,5 mL/tubo = $87,5 \times 10^6$ spz/tubo). O ejaculado foi conservado à uma temperatura entre 15 a 17 °C durante cinco dias, sendo dia da coleta considerado como dia zero (D0) e o sêmen conservado por mais quatro dias (D1, D2, D3 e D4).

Tratamentos experimentais

Na etapa I do experimento, foi separado de cada ejaculado um total de $1,32 \times 10^9$ spz, repartido equitativamente entre três diferentes tratamentos (diluente), conforme esquema a seguir: 01. O diluente Beltsville Thawing Solution (BTS - controle); 02. O diluente água de coco em pó (ACP[®]-103), oriundo da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do spray dry (SALGUEIRO *et al.*, 2002), sendo reconstituído com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP + 100 mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80mg/100 mL; 03. O diluente leite em pó desnatado (LPD), diluído em

água destilada nas seguintes proporções: 10g de LPD + 0,194g de glicose + 100mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80mg/ 100mL. Cada 100g de LPD era composto por: carboidratos (56g); proteínas (20,8g); fibra solúvel (9,6g); sódio (300mg); cálcio (2g); ferro (17,2mg); vitaminas A (564µg), D (6µg), E (18,8mg) e C (92mg) e ácido fólico (480µg).

Na etapa II do experimento, foi utilizado como diluente aquele que apresentou o melhor resultado na etapa I, ao qual foi adicionado três diferentes concentrações do ácido fítico (Sigma P8810). Foi separado de cada ejaculado um total de $1,75 \times 10^9$ spz, repartido equitativamente entre quatro tratamentos, conforme a seguir: 01. Diluente BTS sem adição do ácido fítico (controle - T1); 02. BTS+175µM de ácido fítico (T2); 03. BTS+350µM de ácido fítico (T3) e 04. BTS+525µM de ácido fítico (T4).

Análises do sêmen após conservação

A cada dia de conservação do sêmen (D0 a D4), foram retiradas da geladeira, amostras (tubos de ensaio) de cada ejaculado/tratamento, e em seguida, foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos para posteriores análises, conforme descrito abaixo.

Vigor e motilidade espermática (% células móveis): Para a avaliação da qualidade espermática, foi analisado o vigor espermático (0 a 5. TONIOLLI, 1996) e a motilidade espermática (% de espermatozoides móveis; MARTIN RILLO *et al.*, 1996), colocando-se uma gota de sêmen de 15µL entre lâmina e lamínula, com leitura em microscopia óptica a um aumento de 200 vezes. O sêmen diluído e conservado a 17 °C foi reaquecido a 37 °C, com leituras feitas após 10 minutos de incubação. Essas duas características foram avaliadas em todos os dias de conservação do sêmen.

Integridade acrossomal e vitalidade: Os exames morfológicos foram divididos em 2 (dois) tipos de análises: a) integridade do acrossoma e vitalidade (% de células vivas). Para a análise de integridade do acrossoma e de vitalidade (% de espermatozoides vivos), esfregaços de sêmen foram feitos no D0 (após seis horas de conservação) e no D4. Em ambos os momentos, o sêmen foi reaquecido a 37 °C durante 10 minutos antes das análises, onde eram consideradas a integridade do acrossoma e a vitalidade. Foi medida a osmolaridade da solução e quando necessário, ajustada com água destilada até ficar entre 300 e 310 mOsm. Foram contadas 200 células por esfregaço corado, em microscopia óptica com lente de imersão (aumento de 1000x). A solução corante utilizada foi formada por: azul de bromofenol = 0,1g; citrato de sódio = 0,4g; água destilada = 10mL. A solução foi guardada em geladeira. Juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante, ambas de 15µL, sendo homogeneizadas em seguida. Após 30 segundos, procedeu-se o esfregaço, sendo secado à temperatura ambiente. Para análises, os espermatozoides foram classificados em quatro categorias: 1) Vivos com acrossoma intacto; 2) Vivos com acrossoma danificado; 3) Mortos com acrossoma intacto; 4) Mortos com acrossoma danificado.

Teste de resistência hsmótica: Este teste permite fazer uma avaliação da funcionalidade da membrana do espermatozoide, através de uma prova de resistência a períodos de incubação e ao choque osmótico. O teste hiposmótico também foi realizado nos dias D0 (após seis horas de conservação) e D4, e permitiu a avaliação da qualidade da membrana do espermatozoide, através de uma prova de resistência ao choque osmótico. A técnica consistiu na adição de 1 mL de sêmen diluído em 15 mL de água destilada e mantidos por 15 minutos em banho-maria a 37 °C (solução A). Após o período de incubação, adicionou-se 0,5 mL de formal salino a 1% (solução B) em um volume de 1 mL da solução A, retirando-se em seguida uma alíquota de 15µL, colocada em uma lâmina, recoberta por lamínula e em seguida levado ao microscópio óptico com um aumento de 400x, sendo contados um total de 200 espermatozoides. O espermatozoide com a cauda reta é indicativo de perda de funcionalidade da membrana (ruptura); os que permanecerem com membrana funcional (íntegra) apresentam cauda enrolada.

Análises Estatísticas: as variáveis quantitativas foram avaliadas pelos testes de distribuição normal (Mann Whitney) com os resultados submetidos à ANOVA e apresentados em médias e desvios padrões. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a testes não paramétricos. As variáveis de caráter qualitativo foram submetidas ao teste de dispersão de frequência Chi², corrigido para resultados expressos em porcentagem. A análise das diferenças entre médias foi realizada através de uma variância multifatorial usando General Linear Models do programa Statistical Analysis System (SAS 6.03)³⁵. Para a significância estatística foi utilizado um intervalo de confiança 5% (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa I

O sêmen *in natura* dos 60 ejaculados utilizados do experimento apresentou aspecto normal, coloração branco leitosa, volume médio de 422 mL e concentração média de 237 x10⁶ spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CORRÊA *et al.*, 2001). O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade (%) de 87,9±12,1 e vigor espermático de 4,2±0,6. Estes valores se mantiveram acima dos parâmetros mínimos estipulados pela metodologia para utilização do ejaculado, estando também, dentro da normalidade para o sêmen suíno (CBRA, 2013), podendo desta forma, serem utilizados nos protocolos experimentais.

Os resultados do vigor espermático nas primeiras 24h de conservação do sêmen (D1), não apresentaram diferenças entre os diluentes ACP (2,2±0,8) e LPD (2,3±0,8). Entretanto, no BTS (1,7±0,7) houve uma queda significativa dos valores desta característica (p<0,05) em relação aos outros dois diluentes. Por outro lado, a partir de D2, o BTS apresentou melhores valores para essa característica em relação ao LPD e ACP, os quais apresentaram uma queda significativa do vigor espermático. Após 24 horas de conservação (D1), o diluente ACP apresentou o maior resultado médio para esta

característica, sendo significativamente melhor ($p<0,05$) do que os demais tratamentos (Tab. 01).

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

Tabela 01: Vigor espermático do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

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

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

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

Para a característica de motilidade espermática, os diluentes LPD (57,1%) e ACP (51,2%) apresentaram mais uma vez resultados melhores ($p<0,05$) que o BTS (39,8%) nas primeiras 24h (D1). Por outro lado, o tratamento controle (BTS) manteve uma maior porcentagem de células móveis de D2 (25,9%) até o último dia de conservação (D4 - 21,2%), resultados esses, melhores ($p<0,05$) em relação aos outros dois diluentes testados (Tab. 02). A conservação do sêmen suíno no diluente LPD, à temperatura de 17 °C, não o caracterizou como um bom diluente de uso prolongado, pois com o passar do tempo houve uma deteriorização das características espermáticas, bem como também houve o aparecimento de contaminação bacteriana, que contribuiu para uma queda mais rápida da qualidade espermática (KASIMANICKAM *et al.*, 2011). Tais alterações contribuíram para coagular o leite, fato esse que ocorreu com frequência a partir do D2, dificultando a realização das análises e piorando a qualidade e condições de conservação do sêmen. O LPD deve ser melhor avaliado como diluente de longa duração para o sêmen do varrão.

Em trabalho utilizando a água de coco (ACP) como diluente, com a finalidade de conservar uma maior porcentagem de espermatozoides móveis (BARROS, 2010), os resultados foram inferiores aos do presente estudo, já no primeiro dia de análise. Assim

sendo, o referido autor não indicou o uso do ACP como diluente para o sêmen suíno, tendo em vista sua incapacidade na manutenção desta característica. Essas diferenças encontradas entre esses dois trabalhos, podem indicar uma possibilidade de comportamento individual de cada ejaculado ou de reprodutores em particular, que merecem maiores estudos a fim de se determinar possíveis interações de ejaculados ou de indivíduos, com o tipo de diluente a ser utilizado.

Tabela 02: Motilidade espermática (% de células móveis) do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

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

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

Outra explicação para essa queda acentuada dos valores do vigor e motilidade espermática, pode ser encontrada em uma possível produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que pode subjugar o fraco sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, tornando-o mais susceptível ao estresse oxidativo. Com isso, pode haver uma redução da motilidade dos espermatozoides (MORAES *et al.*, 2015).

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

Porém, ao final do período de conservação (D4) o BTS (35,0%) conseguiu manter uma maior porcentagem de células vivas em relação aos diluentes LPD 28,7% e ACP 22,0% (Tab. 03), sendo significativamente melhores apenas em relação ao ACP (p<0,05), justificando o fato de ser o diluente mais utilizado nos programas de inseminação artificial, também pela facilidade de fabricação e baixo preço de comercialização (LEVIS, 2000). Este resultado ao final do período de conservação do sêmen, pode ter sido devido a uma melhor condição proporcionada aos espermatozoides pelo diluente BTS, conferindo uma maior resistência às EROs produzidas dentro do meio conservante que afeta a vitalidade espermática (MORAES *et al.*, 2015), mas que neste caso esta ação foi minimizada.

Tabela 03: Total de espermatozoides vivos (% - vitalidade), do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

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

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

Conforme resultados apresentados na Tab. 04, o LPD e o ACP mantiveram uma maior porcentagem de células com membrana funcionais, 36,1 e 33,5%, respectivamente no primeiro dia de conservação do sêmen, quando comparado ao BTS 24,2% (p<0,05). Já no último dia de análise (D4) os resultados se inverteram, ou seja, o diluente BTS (35%) obteve valores significativamente melhores (p<0,05) que os demais diluentes, LPD (6,2%) e ACP (6,3%), discordando do observado por Toniolli *et al.* (2010) onde após o mesmo período, o diluente ACP proporcionou melhores condições de proteção aos espermatozoides (p<0,05), com maior número de células com membrana funcional (74,2%) em relação ao BTS (39,0%).

Tabela 04: Espermatozoides com membrana funcional ao teste hiposmótico (%), do sêmen suíno conservado em diferentes diluentes a 17 °C durante cinco dias.

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

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

Desta forma, estas melhores condições de proteção às células espermáticas permitiram que o sêmen chegasse ao final do período de incubação com um maior número de células com membrana funcional, fato este que poderá influenciar positivamente nos resultados de fertilidade com o uso de um ejaculado conservado desta maneira. No presente estudo, pôde-se constatar que em longo prazo o diluente BTS conseguiu sustentar um maior número de células com membrana plasmática reativa em relação aos outros diluentes testados.

Araújo (2012), não observou diferenças significativas (p>0,05) entre o ACP e o BTS nos dias D0 e D4 de conservação do sêmen, discordando dos resultados do presente estudo, onde o ACP e o LPD em D4 (p<0,05) apresentaram um aumento no número de células com membranas não funcionais. Embora este estudo não tenha evidenciado da

mesma forma esta qualidade do ACP, tal fato não o descredencia como diluente para o sêmen suíno no tocante a funcionalidade de membrana.

No presente trabalho, apesar de incubação e temperaturas mais baixas promoverem aumento do número de células mortas e de membranas não funcionais, esse tipo de problema foi minimizado quando se utilizou o BTS, possibilitando sua utilização em conservações prolongadas do sêmen.

Diante dos resultados apresentados na etapa I, concluímos que o melhor diluente a ser utilizado na etapa II foi o BTS, por manter resultados mais estáveis durante todo o período de conservação do sêmen a 17 °C, apesar do LPD e ACP terem sido melhores nas primeiras 24h.

Etapa II

A fração espermática do sêmen *in natura* dos 60 ejaculados analisados do experimento apresentou aspecto normal, coloração branco leitoso, volume médio de 340 mL e concentração média de 275×10^6 spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CORREA *et al.*, 2001). O sêmen *in natura* apresentou uma motilidade média de $91\% \pm 7,8$ e vigor de $4,2 \pm 0,5$. Estes valores se mantiveram acima dos parâmetros mínimos estipulados pela metodologia para utilização do ejaculado.

Segundo Stedman (2003), o termo antioxidante significa impedir a oxidação de outras substâncias químicas, tendo por função regenerar o substrato ou prevenir sua oxidação. O equilíbrio entre agentes óxido-redutores (EROs) e o sistema de defesa antioxidante é essencial (NOGUEIRA *et al.*, 2014). A adição de antioxidantes aos diluentes vem sendo testada, visando proteger os espermatozoides dos efeitos tóxicos das EROs e minimizar as injúrias celulares decorrentes dos processos de conservação (GUERRA *et al.*, 2012).

Na característica vigor espermático, entre os resultados dos diferentes tratamentos não houve nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$). Porém, foi observado que, durante o período de conservação do sêmen, o uso de concentrações progressivas do ácido fítico proporcionou uma queda mais lenta no valor médio do vigor espermático (Tab. 05). Esta tendência pode indicar a possibilidade de que concentrações mais altas desse antioxidante adicionado ao diluente de sêmen suíno, poderá apresentar melhores resultados de vigor espermático. Entretanto, a melhor concentração ainda precisa ser confirmada através de experimentos suplementares.

Embora o plasma seminal seja rico em antioxidantes e ofereça proteção ao espermatozoide, esta condição não é suficiente para minimizar os danos causados pelas baixas temperaturas de conservação do ejaculado. Portanto, seria necessário por um lado, reduzir a produção de EROs, e por outro aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis para as células dentro dos meios de conservação do sêmen (GUERRA *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2009), fatos estes que poderiam minimizar os efeitos negativos sobre os espermatozoides.

Independente do mecanismo de formação das substâncias oxidantes sabe-se que esta produção é intrínseca aos espermatozoides, particularmente os imaturos e

morfologicamente anormais, os quais potencializam a produção de EROs no sêmen (MARCHESI e FENG, 2007; MAIA e BICUDO, 2009; MAIA *et al.*, 2010). Desta forma, composição de meios diluentes que favoreçam a proteção das características morfológicas espermáticas, podem permitir uma menor produção de EROs e conseqüentemente uma melhor conservação espermática.

Tabela 05: Vigor espermático do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico (AF).

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

a, b, c, letras diferentes na mesma coluna diferenças significativas (p<0,05)
 T1 = BTS (controle); T2 = BTS+175µM AF; T3 = BTS+350µM AF e T4 = BTS+525µM AF.

Para os espermatozoides móveis (Tab. 06) em D0, D1 e D4, com a concentração de 525 µM (T4) do ácido fítico, obteve-se um aumento significativo dessa característica em relação ao tratamento controle (T1). Em estudo feito com outro antioxidante (Trolox) adicionado ao BTS, apresentou melhores resultados médios motilidade espermática em relação ao controle (TONIOLLI *et al.*, 2012). Aparentemente, o uso de antioxidante adicionado ao diluente do sêmen do varrão, traz efeitos benéficos para esta característica, entretanto, qual o melhor antioxidante e sua concentração ideal ainda precisam ser encontrados. Este mesmo efeito sobre o total de células móveis na conservação de sêmen foi observado por Sarlós SABLÓS *et al.*, 2012) no sêmen ovino, comprovando esta ação positiva em outra espécie animal. Segundo esses autores, o efeito se deve à alta capacidade do antioxidante em inibir a lipoperoxidação.

Tabela 06: Total de espermatozoides móveis (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico (AF).

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

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

T1 = BTS (controle); T2 = BTS+175µM AF; T3 = BTS+350µM AF e T4 = BTS+525µM AF.

O mecanismo responsável pela produção de EROs no espermatozoide ainda não está totalmente elucidado. A possível presença de uma oxidase na sua membrana plasmática, que quando ativa, dá origem a espécies reativas ao oxigênio que promovem sérios danos à célula (MAIA e BICUDO, 2009). Desta forma, aparece um declínio da qualidade espermática de forma irreversível em garanhões BAUMBER *et al.*, 2003) bem como em suínos (VALENÇA e GUERRA, 2007), que pode ser ao menos minimizado com a adição de substâncias antioxidantes ao meio diluente do sêmen.

Os resultados da porcentagem de espermatozoides vivos (Tab. 07) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos utilizados, porém, como foi visto na característica vigor espermático, à medida que se utilizou maiores concentrações de ácido fítico adicionado ao meio diluente, observou-se uma queda mais lenta na porcentagem média de células vivas. Esta tendência de resultados pode indicar uma ação protetora do ácido fítico, que manteve-se estável entre o primeiro e último dia de conservação, entretanto, uma verdadeira e constante ação protetora, relacionada a uma determinada concentração desta substância, ainda precisa ser melhor determinada.

Tabela 07: Total de espermatozoides vivos (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico (AF).

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

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

T1 = BTS (controle); T2 = BTS+175µM AF; T3 = BTS+350µM AF e T4 = BTS+525µM AF.

Em estudos feitos por Beconi (BECONI *et al.*, 1993), foi encontrado um maior percentual de espermatozoides vivos com acrossoma intacto ao adicionarem as vitaminas C (5 mM) e E (1,0 mg/mL) ao diluente de sêmen bovino. Peixoto (2007), com a adição de vitamina C (600 µM/L) obteve resultados semelhantes com o sêmen de ovinos. A adição de 50 mg deste antioxidante no sêmen de caprinos, melhora a motilidade, a integridade estrutural da membrana e maior viabilidade espermática (CASTILHO *et al.*, 2009).

No presente trabalho, apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos, mais uma vez ocorreu uma queda menos acentuada do número de espermatozoides vivos, quando na presença de maiores concentrações de ácido fítico adicionado ao meio diluente. As diferenças encontradas entre os resultados deste trabalho em relação aos dos autores acima, podem ter sido devido a diferenças entre os antioxidantes, utilizados bem como a espécie animal em questão. Neste contexto a

utilização de concentrações mínimas de antioxidantes no sêmen, poderá manter parâmetros espermáticos melhores, em detrimento da redução da produção de EROs, durante a conservação à baixas temperaturas (COSTA *et al.*, 2015).

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

Em relação ao teste hiposmótico, o tratamento com a maior concentração de ácido fítico (T4), obteve melhor resultado ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento controle tanto em D0 quanto em D4 (Tab. 08), proporcionando uma maior porcentagem de células com membrana funcional.

Tabela 08: Total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%) do sêmen suíno conservado em BTS a 17 °C durante cinco dias, com diferentes concentrações de ácido fítico (AF).

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

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

T1 = BTS (controle); T2 = BTS+175µM AF; T3 = BTS+350µM AF e T4 = BTS+525µM AF.

Altas taxas de EROs podem inibir o metabolismo energético dos espermatozoides dentre outros problemas, que favorecem o aparecimento de um estresse oxidativo, aumentando a fluidez da membrana plasmática, com perda de sua função seletiva de transporte (SAYRE *et al.*, 2008; SICHERLE *et al.*, 2011). Pelos resultados obtidos nesse trabalho, percebeu-se um aumento de membranas espermáticas funcionais com o aumento das concentrações do ácido fítico adicionado ao diluente. Desta forma, essa substância abre novas possibilidades de proteção à membrana plasmática e conservação do ejaculado do varrão.

Estudos têm mostrado que a vitamina E (α -tocoferol) é capaz de proteger as células de estresse oxidativo (TIRADO e BROWN, 2005) e de danos das membranas plasmática e acrossomal (MAIA, 2006). Os resultados do presente estudo corroboram com estas afirmações, já que foi obtido com o uso das maiores concentrações de ácido fítico adicionado ao diluente do sêmen, os melhores resultados ($p < 0,05$) de proteção das células contra os danos oxidativos sobre a membrana plasmática.

A adição de antioxidantes ao meio diluente em protocolos de refrigeração de sêmen tem sido testada, no intuito de reduzir ou interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas (COYAN *et al.*, 2010). Esta necessidade inclui, além da identificação dos antioxidantes, também as suas melhores concentrações, visando a diminuição do estresse oxidativo e dos danos espermáticos, possibilitando assim uma maximização dos efeitos dos diluentes (MORAES *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016). Neste sentido, a melhor concentração do ácido fítico ainda tem que ser determinada, a fim de se poder obter uma maximização deste do efeito benéfico desta substância.

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.R.S. Uso de diluentes alternativos a baixas temperaturas na manutenção da qualidade espermática do sêmen suíno. 93p. 2012. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 2012. Disponível em: <<http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/linaraquel.pdf>>. Acesso em: 10/04/2013.
- BARROS, T.B. Qualidade espermática do sêmen suíno conservado a baixas temperaturas em diluentes alternativos. 66p. 2010. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 2010. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/tatyane_barros.pdf>. Acesso em: 10/05/2012
- BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; SOUZA, L.P.; FEUGANG, J.M.; TONIOLLI, R. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar semen freezing procedure. SEMINA: Ciências Agrárias. v.36, n.3, suplemento 1, p.2023-2030, 2015.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. Journal of Andrology. v.24, n.4, p.621-628, 2003.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. American Journal of Veterinary Research, v.66, p.772-779, 2005.

BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v.40, p.841-849, 1993.

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

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

CASTILHO, F.E.; GUIMARÃES, D.J.; MARTINS, F.L. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal., 3ª ed., Belo Horizonte, 2013. 104p.

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

COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L. Preservation of goat pre-antral follicles in saline or coconut water solution. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, p.324-330, 2012.

COSTA, J.M.S.; SOUZA, W.L.; MORAES, E.A. Adding antioxidants to ram sperm improves sperm binding capability after cryopreservation. *Journal of Animal Science*, v.93, n.2, p.114-115, 2015.

COSTA, J.M.S.; SOUZA, W.L.; MORAES, E.A. Effect of Trolox C and ascorbic acid on the binding capacity of sperm ram after cryopreservation. In: 42nd Annual Conference of the IETS. Reproduction, Fertility and Development. Louisville-KY, v.28, p.154-155, 2016.

COYAN, K.; PINAR, N.B.; BUCAK, M.N. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*, v.89, n.3, p.426-431, 2010.

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

FOOTE, R.H. Artificial Insemination. In: HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animals. Philadelphia: 3ª ed., Ed. Lea and Lebigier, p.409-431, 1974.

GUERRA, M.M.P.; CÂMARA, R.D.; SILVA, B.C.E. Uso de antioxidantes em ovinos. *Ciência Animal*, v.22, n.1, p.354-364, 2012.

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

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. *Veterinary Record*, v.71, p.664-665, 1959

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

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

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

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., Beltsville, Maryland USA, 2000. Proceedings... Beltsville, 2000. p.121-128.

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

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

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO HC. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, v.85, n.2-3, p.85-90, 2009.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamífero: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SIRCHERLE, C.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extender with antioxidants. *Small Ruminant Research*, v.23, n.1-2, p.122-118, 2010.

MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *Journal of Andrology*, v.28, n.4, p.481-489, 2007.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.519-526, 1996.

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

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

MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S.; SOUZA, W.L. Antioxidants improve membrane integrity and acrossome and sperm mitochondrial activity in ram sperm after cryopreservation. *Joint Annual Meeting. Journal of Animal Science*, v.98, n.2, p.427-428, 2015.

NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamífero. *Revista Electrónica de Veterinária*, v.15, n.1, p.1-15, 2014.

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

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

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

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. Revista Brasileira de Reprodução Animal, sup.1. n.5, p.156-160, 2002.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. Acta Veterinaria Hungarica, v.50, n.2, p.235-245, 2012.

SAYRE, L.M.; PERRY, G.; SMITH, M.A. Oxidative stress and neurotoxicity. Chemical Research in Toxicology, v.21, n.1, p.172-188, 2008.

SICHERLE, C.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. Small Ruminant Research, v.95, n.1-2, p.144-149, 2011.

STEDMAN, T.L. Stedman: dicionário médico. 27^a ed. Rio de Janeiro, 2003. 219p.

STRYER, L. Bioquímica. 4^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.

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

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

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

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

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

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

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