

MOTILIDADE, VIGOR E QUALIDADE ACROSSOMAL DO SÊMEN DESCONGELADO DE VARRÃO EM DIFERENTES DILUENTES

(Boar semen motility, vigour and acrosomal quality in diferents extender after thawing)

Ricardo TONIOLLI¹; Luciana de Souza TONIOLLI²; Tatyane Bandeira BARROS³;
Daianny Barboza GUIMARÃES³; Jonathan Maia da Silva COSTA³

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen (LRSTS), FAVET/UECE – Av. Silas Manguba, 1700 - Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60 740-000; ²Estagiária de IC do LRSTS; ³Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV/UECE). E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

Objetivou-se determinar um diluente que proporcionasse uma boa manutenção da viabilidade do sêmen do varrão, após descongelação. Foram utilizados os seguintes diluentes: Beltsville Thawing Solution (BTS), BTS + ácido 3-indol acético (IAA) e Androhep (ADHP). Os 24 ejaculados foram analisados *in natura* e após diluição, quanto ao vigor, motilidade espermática e integridade do acrossoma. Em seguida, foi retirado de cada ejaculado um total de $10,2 \times 10^9$ espermatozoides, que foram repartidos igualmente entre os diferentes tratamentos experimentais. Os ejaculados foram diluídos em partes iguais (1:1) a 30 °C, permanecendo incubados por 2 horas, antes de iniciar a curva de congelação. Posteriormente, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, em uma concentração de 112×10^6 spz/mL, submetidos a vapor de nitrogênio por quatro minutos, em seguida, mergulhado no nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras foram descongeladas em banho-maria à temperatura de (37 °C/30s), em seguida, o conteúdo foi ressuspensão nos diferentes diluentes (1:5). As amostras foram avaliadas quanto às mesmas características do sêmen *in natura*. Na análise estatística, foram utilizados os testes de Mann-Whitney, com intervalo de confiança de 5%. O diluente BTS apresentou motilidade e vigor espermático melhores, em relação aquele contendo ADHP, em 5 minutos de incubação; porém, não houve diferenças significativas sobre as mesmas avaliações, quando os tratamentos foram incubados por 1 hora. A integridade acrossomal do diluente ADHP proporcionou maior número de espermatozoides integros ($p < 0,05$), em relação aos demais tratamentos. Um diluente que favoreça a conservação de uma melhor qualidade espermática após descongelação ainda precisa ser desenvolvido.

Palavras-chave: Sêmen, diluente, conservação, varrão.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine a diluent that would provide good maintenance of the boar's semen viability after thawing. The following diluents were used:

*Endereço para correspondência:
ricardo.toniolli@uece.br

Beltsville Thawing Solution (BTS), BTS + 3-indole acetic acid (IAA) and Androhep (ADHP). The 24 ejaculates were analyzed *in natura* and after dilution, regarding sperm vigor and motility and acrosome integrity. Then, a total of $10,2 \times 10^9$ spermatozoa were removed from each ejaculate, which were equally distributed among the different experimental treatments. The ejaculates were diluted in equal parts (1:1) at 30 °C and incubated for 2 hours before starting the freezing curve. Subsequently the semen was packed in 0,5 mL vats, at a concentration of 112×10^6 spermatozoa/mL, submitted to nitrogen vapor for 4 minutes and then immersed in liquid nitrogen (-196 °C). Samples were thawed in a water bath at (37 °C/30s), then the contents were resuspended in the different diluents (1:5). The samples were evaluated as many as the same characteristics of semen *in natura*. In the statistical analysis, the Mann-Whitney tests were used, with a confidence interval of 5%. The BTS diluent had better sperm motility and vigor compared to ADHP in 5 minutes of incubation, but there were no significant differences on the same evaluations when the treatments were incubated for 1 hour. The acrosomal integrity of the ADHP diluent provided a higher number of intact spermatozoa ($p < 0.05$) in relation to the other treatments. A extender that favors the conservation of a better sperm quality after thawing, still needs to be developed.

Key Words: Semen, diluent, conservation, boar.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) ofereceu inúmeros benefícios para a suinocultura, através de melhorias na biossegurança e na disponibilidade de material genético de alta qualidade (BORTOLOZZO *et al.*, 2005; BAILEY *et al.*, 2008; KNOX *et al.*, 2011). O espermatozoide suíno é um dos mais sensíveis aos eventos relacionados ao resfriamento, visando sua conservação. Esta sensibilidade esteve relacionada à agressão sobre a membrana plasmática e outras organelas celulares, ocasionados pelo choque térmico (GUTHRIE; WELCH, 2005).

Desta forma, o processamento do sêmen com diluentes adequados é um dos

pontos importantes para sua conservação. O diluente possui várias funções, tais como, aumentar o volume do ejaculado, fornecer nutrientes para a produção de energia, proteger os espermatozoides contra o choque térmico, controlar a variação de pH, manter o balanço osmótico e inibir o desenvolvimento bacteriano (CORRÊA *et al.*, 2001, BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

O primeiro teste de laboratório mais utilizado para a avaliação de machos foi a porcentagem de células móveis do ejaculado (SLAWETA *et al.*, 1981), correlacionada à possibilidade de uma maior taxa de fecundação. A observação pura e simples da motilidade não era suficiente para apreciar a qualidade

potencial do sêmen (EINARSON e VIRING, 1973).

A morfologia dos espermatozoides foi, igualmente, um indicador importante desta qualidade, uma vez que ela influenciou a taxa de partos e a prolificidade (WABERSKI *et al.*, 1990). A literatura mostrou resultados positivos relativos às características morfológicas, com a utilização do BTS em relação aos diluentes Kiev e Zorlesco (PEREZ MARCOS *et al.*, 1991). Entretanto, até o presente momento, não existiu uma definição clara de um sêmen fértil, apesar da grande variedade de testes laboratoriais (YAVETZ *et al.*, 1995).

O uso do sêmen, sem perda de sua capacidade fecundante, foi fundamental na área de reprodução suína, especialmente no desenvolvimento de uma melhor tecnologia de manipulação do ejaculado, seja ele *in natura*, resfriado e, principalmente, congelado. Deste modo, a conservação de sêmen, principalmente na forma congelada, associada à IA foi primordial em qualquer programa de ganho genético, por estocar material de animais que estejam temporaria ou permanentemente inábeis à reprodução e permitir uma ampla difusão desse material genético de animais considerados superiores (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Entretanto, a IA com sêmen congelado representou apenas 2% das inseminações em suínos, devido aos resultados ruins desta tecnologia, que danificou cerca de 50% dos espermatozoides (MAIA e BICUDO, 2009; ROCA *et al.*, 2011). Isto ocorre porque cerca de 60% dos lipídios presentes na membrana plasmática foram ácidos graxos poliinsaturados, o que conferiu à membrana uma grande fluidez, devido à quantidade de duplas ligações ou ligações insaturadas existentes. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar um diluente que proporcionasse uma boa manutenção da viabilidade espermática, após descongelação em diferentes condições de meio de diluição.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento e animais

O experimento foi realizado na cidade de Fortaleza, Ceará, localizada a 03° 43' 02" de latitude S e 38° 32' 35" de longitude O, com altitude média de 21 m, índice pluviométrico anual de 1600 mm e temperatura média anual em torno dos 26°C. Foram utilizados reprodutores mantidos em um sistema de confinamento, em baias individuais. A dieta fornecida apresentava 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), com um consumo diário de 2,5 Kg/dia, em dois arraçoamentos e água potável ad libitum. Os cuidados e procedimentos com os animais utilizados para coleta de sêmen foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, sob o Protocolo nº 04463277-0 em 02 de maio de 2005.

Coleta e avaliação do ejaculado *in natura*

O sêmen de cinco reprodutores, foi coletado uma vez por semana, durante 8 semanas consecutivas (n=40), pela utilização da técnica da mão enluvada e o material biológico coletado em recipiente coberto por gaze e protegido por copo térmico (HANCOCK e HOVELL, 1959). Imediatamente após a coleta, separou-se o ejaculado total da fração gelatinosa. Em seguida, cada ejaculado foi avaliado quanto à temperatura (°C), volume (mL), concentração ($\times 10^6$ sptz/mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptz), vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996) e porcentagem de células móveis (0 a 100%) MARTIN RILLO, 1996), sendo utilizados no experimento os ejaculados que apresentaram valores $\geq 3,5$ de vigor e $\geq 85\%$ de células móveis (CBRA, 2013).

Tratamentos experimentais

De cada ejaculado foi retirado um total de $10,2 \times 10^9$ espermatozoides por tratamento experimental. Foram três os diluentes utilizados nos protocolos: a) T1 = Diluente Beltsville Thawing Solution - controle (BTS); b) T2 = BTS + ácido 3-indol acético, à concentração de 10 ng/mL (IAA) e c) T3 = Diluente Androhep (ADHP). Os diluentes foram mantidos à temperatura de 30 °C, visando a diluição do sêmen na proporção de 1:1. Após descongelação, o sêmen foi ressuspensão à proporção de 1:5 com o diluente, conforme metodologia a seguir.

Congelamento e descongelamento do sêmen

Amostras dos ejaculados foram pré-diluídas em partes iguais (1:1) a 30 °C, nos três diferentes diluentes (BTS, IAA e ADHP), permanecendo incubadas por 2 horas, antes de iniciar a curva de resfriamento do sêmen, visando a congelamento. O sêmen foi congelado pela técnica de Paquignon *et al.* (1974) modificada, em palhetas de 0,5 mL, à uma concentração de 112×10^6 sptz/mL, colocado em vapor de nitrogênio por 5 minutos e, em seguida, mergulhado no nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras ficaram congeladas por, pelo menos, 48 horas, antes da descongelação e análises.

As amostras foram descongeladas em banho-maria, à temperatura de 37 °C, por 30 segundos; em seguida, o conteúdo de cada palheta foi retirado e ressuspensão nos diferentes diluentes à uma proporção de 1:5 (0,5mL sêmen: 2mL de diluente), para posteriores análises. Os mesmos diluentes da pré diluição a 30 °C foram repetidos após descongelação, na ressuspensão do conteúdo das palhetas, não havendo, desta forma, mistura de diluentes.

Análises após descongelação do sêmen

Vigor e motilidade espermática:

Para a avaliação da qualidade espermática, foram levadas em consideração as características de vigor espermático (notas de 0 a 5 – TONIOLLI, 1996) e da porcentagem de células móveis (motilidade - valores de 0 a 100%), avaliadas através da microscopia óptica, em aumento de 200x. O sêmen descongelado e ressuspensão foi colocado em "banho maria" a 37 °C, durante 60 minutos, com leituras feitas aos 10 e 60 minutos de incubação (teste de termorresistência - TTR), colocando-se uma alíquota de 15 µL da amostra entre lâmina e laminula. Para cada análise, foram descongelados as palhetas referentes a cada ejaculado, em cada tratamento.

Integridade acrossomal:

Para se proceder a este exame, foi feito um esfregaço de sêmen; sendo o mesmo corado pela solução de azul de bromo-fenol, sendo contadas 200 células por amostra. Os exames foram feitos através da microscopia óptica, com lente de imersão a um aumento de 1000x nas amostras descongeladas, ressuspensas e incubadas a 37 °C, por 10 minutos. A solução corante foi formada por: azul de bromo-fenol = 0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada = 10 mL. A osmolaridade da solução foi aferida e ajustada quando necessário, com água destilada, até ficar entre 300 e 310 mOsm. A solução foi conservada em geladeira a 10 °C. Para se preparar o esfregaço para análise, juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante (ambas de 30 µL) e foi homogeneizada; após 30 segundos retirou-se uma gota desta mistura, para preparo do esfregaço úmido (MEDEIROS *et al.*, 2006), que foi seco à temperatura ambiente (25 °C), antes das análises. O sêmen e o corante estavam à mesma temperatura. Segundo a integridade acrossomal, os espermatozoides foram classificados (VALE FILHO, 1980; KUMUS, 1993) em: 01) NAR = acrossoma normal; 02) PAR = acrossoma em processo de destacamento; 03) SAR = acrossoma ausente; 04) EAR = acrossoma

inchado; 05) DAR = acrossoma com defeito (má formação).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com aplicação do teste de Mann-Whitney para a comparação entre grupos. O bloco é um conjunto de unidades experimentais (UE) homogêneas, que recebe cada tratamento, igualando o número de unidades experimentais ao de tratamentos, sendo casualizados sobre as unidades experimentais, dentro de cada bloco. A análise das diferenças entre médias foi feita por variância multifatorial, usando-se o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03), com um intervalo de confiança de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os valores da característica vigor espermático (Fig. 1), aos dez minutos de incubação, o melhor resultado foi obtido com o diluente BTS (2,2), em relação ao ADHP (2,0) ($p < 0,05$). A adição do IAA ao BTS não apresentou nenhuma influência positiva, em relação a esta característica; inclusive, não apresentando diferença significativa com o resultado do ADHP ($p > 0,05$). Após o período de uma hora de incubação, o percentual de queda do vigor espermático foi um pouco maior nos diluentes BTS e IAA; mas ele ocorreu em todos os tratamentos, não havendo diferenças significativas entre eles, ao final do período ($p > 0,05$).

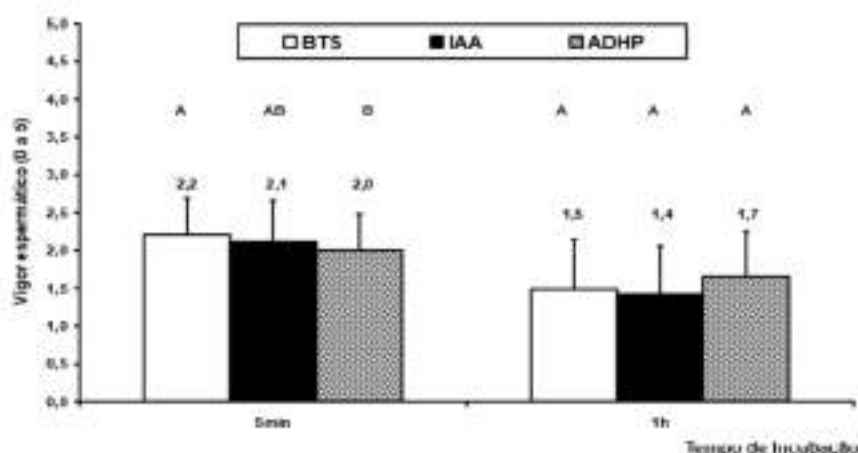


Figura 1: Vigor espermático do sêmen suíno descongelado e ressuspensão em diferentes diluentes, incubado a 37 °C, durante 60 minutos.

A queda do vigor espermático é uma característica comum do espermatozoide congelado, devido ao choque térmico e ao estresse osmótico, ambos causados pelo processo de criopreservação (WATSON, 2000). Os resultados do vigor neste trabalho corroboram com Tonioli *et al.* (2009), demonstrando que a concentração adotada para o IAA neste experimento, não foi capaz de melhorar o vigor espermático pós descongelação. Os resultados encontrados por outros autores (TONIOLLI *et al.*, 2001 e 2009) utilizando o IAA, corroboraram com os deste trabalho, reforçando a necessidade de ser evidenciada uma possível ação benéfica desta substância (IAA), sobre a célula espermática. Os resultados desse experimento sugerem a necessidade de uma incubação prévia mais prolongada do sêmen e também com diferentes concentrações dessa substância adicionada ao diluente, com objetivo de se observar uma possível e efetiva ação positiva do IAA sobre a viabilidade da célula espermática.

Contudo, neste estudo, não se verificou uma queda acentuada do vigor, após uma hora de incubação. Pode-se então presumir, que houve uma maior proteção contra o choque térmico, o que evidenciou uma melhor ação de proteção e conservação dos meios utilizados (KULAKSIZ *et al.*, 2012). Nenhum dos

meios utilizados impediu uma diminuição dos valores do vigor durante o período de incubação do sêmen, pois uma queda de motilidade dos espermatozoides após a ejaculação, independe do meio de conservação utilizado. Assim sendo, dependendo do tipo de diluente utilizado, poderá haver diferentes taxas de diminuição de motilidade, fato este verificado neste trabalho, após incubação no diluente Androhep, com um valor médio maior para esta característica, apesar de não haver diferença estatística entre os resultados.

Analisando-se a motilidade espermática, aos cinco minutos de incubação, mais uma vez a adição do IAA ao BTS (38,1%), não apresentou resultado satisfatório em relação aos outros dois diluentes testados. Mais uma vez o diluente BTS apresentou o melhor resultado (42,9) sendo superior ao ADHP (35,8) ($p < 0,05$). Após 1 hora de incubação houve também um decréscimo da motilidade, dessa vez de forma mais acentuada, embora sendo um pouco menor quando se usou o diluente ADHP, mas não apresentou nenhuma diferença ($p > 0,05$) entre os três diferentes tratamentos (**Fig. 2**). Entretanto, independente do diluente todos os valores ficaram abaixo dos 50%, resultados estes que se assemelharam aos obtidos por outros autores (PAQUIGNON *et al.*, 1974).

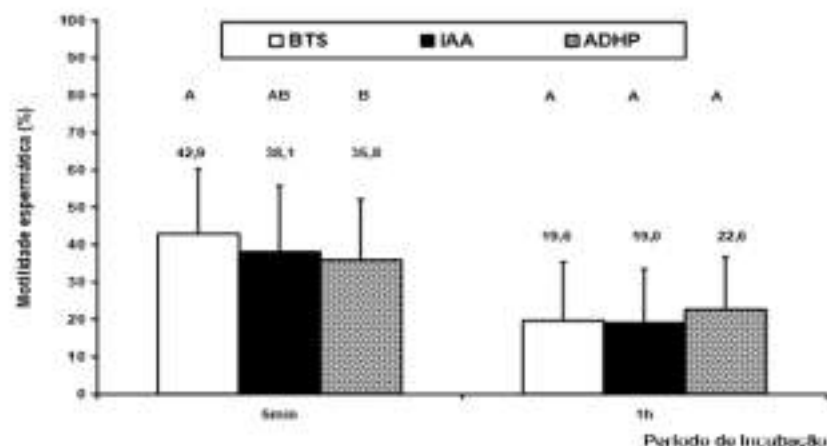


Figura 2: Motilidade espermática do sêmen suíno descongelado após ressuspensão em diferentes diluentes e incubado a 37 °C durante 60 minutos.

Os resultados da motilidade espermática em todos os tratamentos, foram superiores do que os obtidos por Dziekonska *et al.* (2015) ao utilizarem BTS (30, 55%) e ADHP (20, 18%) em sêmen descongelado de varrões. Por outro lado, foram similares aos resultados obtidos por Toniolli *et al.* (2009) que utilizaram os mesmos diluentes, além do IAA. Possivelmente esta variação de resultados, com a utilização de mesmos diluentes, pode estar relacionado com a o tipo de curva de resfriamento usada pelos pesquisadores, além da proporção de diluente utilizado na pré diluição, além do tempo em que este meio fica em contato com o sêmen até sua centrifugação e eliminação do sobrenadante.

Este desempenho do IAA adicionado ao meio diluente, está relacionado com a possibilidade desta

auxina de origem vegetal, promover junto aos espermatozoides um incremento na motilidade e conseqüentemente um aumento na taxa de fertilidade (NUNES *et al.*, 1996; TONIOLLI *et al.*, 2001). Esta relação do IAA com a motilidade espermática, merece estudos adicionais. Do mesmo jeito, avalia-se o ADHP, que possui uma capacidade de tamponamento que afeta a atividade metabólica da célula espermática (GĄCZARZEWICZ *et al.*, 2015) e conseqüentemente aumenta a capacidade de motilidade dos espermatozoides em várias espécies animais (PARRILA *et al.*, 2009, SARIOZKAN *et al.*, 2013). Esta melhora estaria também associada à presença de albumina sérica bovina (BSA) no ADHP, que contribui para o influxo de ions de Ca_2 na célula, mantendo a sua motilidade (DZIEKONSKA *et al.*, 2015). Entretanto,

os resultados deste trabalho não conseguiram reproduzir e confirmar tal afirmativa desses autores, sugerindo a necessidade de maiores estudos relacionados ao mecanismo de movimentação e produção de energia dos espermatozoides.

Os resultados da motilidade espermática de um ejaculado são importantes devido ao fato de que ela é considerada como característica primordial para a fecundação, particularmente na espécie suína. Esta característica proporciona condições favoráveis para o espermatozoide percorrer o trato reprodutivo feminino e realizar uma efetiva penetração nas células do *cumulus* e zona pelúcida do oócito. Além disso, a avaliação da motilidade de sêmen pode ser correlacionada, mesmo que de forma subjetiva, com provas de capacidade fecundante em testes *in vitro* (JANUSKAUSKAS *et al.*, 2001), o que daria uma melhor noção da capacidade fecundante de um determinado ejaculado.

As análises morfológicas, por sua vez, indicaram que o diluente ADHP proporcionou um maior número de células com acrossoma intacto (NAR = 65,7%) indicando melhores condições de conservação dos espermatozoides no tocante a esta característica. Este resultado foi significativamente melhor quando comparado ao tratamento controle (BTS,

NAR = 55,8%) ($p < 0,05$) (Fig. 3). Para esta característica, mais uma vez a adição do IAA ao diluente não apresentou os efeitos benéficos esperado, com o resultado (NAR = 59,5%) não apresentando diferenças estatísticas em relação aos outros dois tratamentos, apesar da afirmativa de que a adição de diferentes substâncias ao meio podem favorecer uma maior porcentagem de espermatozoides com NAR (YI *et al.*, 2002).

No que se refere a integridade acrossomal, observou-se que o meio diluente ADHP conservou um maior número de espermatozoides integros. Esta ação protetora foi superior a evidenciada por Dziekońska *et al.* (2015) e semelhante a encontrada por Toniolli (1999) trabalhando com sêmen resfriado, demonstrando uma ação positiva deste diluente sobre a manutenção da qualidade acrossomal do sêmen suíno. Segundo Toniolli (1996), para o sêmen congelado é necessário um maior tempo de contato do IAA do meio diluente com os espermatozoides durante a curva de resfriamento. Os bons resultados obtidos com o ADHP, foram devidos provavelmente à sua composição química mais elaborada, sendo classificado como diluente de longa duração, e uma vez que possui uma ação protetora sobre as membranas celulares (PAGUIGNON, 1984), ligando-se seletivamente a

membrana, proporcionando uma redução da peroxidação lipídica e favorecendo uma

possível elevação nas taxas de fecundação (WEIZE, 1991).

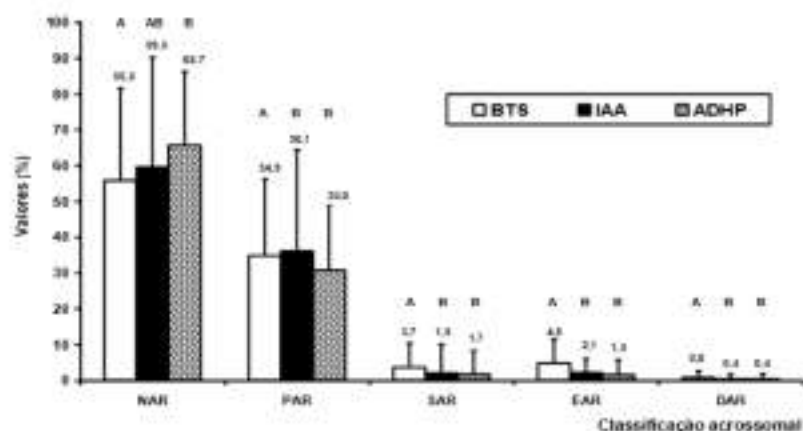


Figura 3: Integridade acrossomal do sêmen suíno descongelado após ressuspensão em diferentes diluentes e incubado a 37 °C durante 10 minutos.

CONCLUSÕES

As melhores condições de motilidade do sêmen no diluente BTS poderá proporcionar melhores resultados de fertilidade e poderá abrir novas perspectivas na utilização da criopreservação do sêmen suíno. Por outro lado, o ADHP proporcionou um melhor "status" acrossomal, fato este de importância para a fecundação, e que também deve ser considerado. Um diluente que favoreça a conservação de uma melhor qualidade espermática após descongelação, ainda precisa ser desenvolvido. Maiores estudos no sentido de se determinar uma melhor concentração do IAA são necessários. A curva de resfriamento

associada ao momento e taxa de diluição do sêmen, devem também ser melhor estudados e se necessários corrigidos, visando uma maior ação benéfica sobre a viabilidade do sêmen descongelado.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, J.; LESSAR, C.H.; JACQUES, J.; BREQUE, C.H.; DOBRISNSKI, I.; ZENG, W. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, v.70, p.1251-1259, 2008.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta*

- Scientificae Veterinariae, v.33, n.1, p.17-32, 2005.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. Manual para exame e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte. v.2, 2013. 45p.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA Jr. T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, p.181, 2001.
- DZIEKOŃSKA, A.; ZASIADCZYK, M.; LECEWICZ, R.; STRZEŻEK, M.; KOZIOROWSKA, G. Effects of storage in different semen extenders on the pre-freezing and post-thawing quality of boar spermatozoa. Polish Journal of Veterinary Sciences. v.18, n.4, p.733-740, 2015.
- EINARSON, S.; VIRING, S. Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different intervals after insemination. Journal of Reproduction and Fertility, v.32, p.117-120, 1973.
- GĄCZARZEWICZ, D.; UDAŁA, J.; PIASECKA, M.; BŁASZCZYK, B. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. Turkish Journal of Biology, v.39, p.582-594, 2015.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. Theriogenology, v.63, p.316-410, 2005.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. Veterinary Record, v.71, p.664-665, 1959.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. Theriogenology, v.55, n.4, p.947-961, 2001.
- KNOX, R.V. The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies. Reproduction Domestic Animal, v.46, p.4-6, 2011.
- KULAKSIZ, R.; ÇEBİ, Ç.; AKÇAY, E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, v.36, n.2, p.177182, 2012.
- KUMUS, S.A. (Ed.) Manual de inseminación artificial porcina. Madrid (Espanha), 1993. 81p.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- 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.
- MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método de coloração vital para a avaliação do espermatozoide ovino. *Revista Ciência Agrária*, v.46, p.287-297, 2006.
- NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; OLIVEIRA, L.F.; TEIXEIRA, M.D. Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação *in vitro* do sêmen na espécie caprina. *Ciência Animal*, v.2, p.32-43, 1996.
- PAQUIGNON, M. Semen technology in the pig. *Current Topics in Veterinary Medicine Animal Science*, v.30, p.202-218, 1984.
- PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M.; du MESNIL du BUISSON F. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude *in vitro*. *Journée de Recherche Porcine en France*, v.5, p.71-76, 1974.
- PARRILA, I.; VAZQUEZ, J.M.; CABALLERO, I.; GIL, M.A. Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs. *Society for Reproduction and Fertility*, v.66, p.37-50, 2009.
- PEREZ MARCOS, C.; SANCHEZ, R.; PALACIO, M.; PURSEL, V.G.; PEREZ GARCIA, T.; MARTIN RILLO, S. Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stores at 15 °C. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26, p.112-116.
- ROCA, J.; PARRILLA, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GIL, M.A.; CUELLO, C. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reproduction Domestic Animal*, v.46, p.79-83, 2011.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.
- SARIOZKAN, S.; TURK, G.; CANTURK, F.; YAY, A. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology*, v.67, p.1-6, 2015.
- SLAWETA, R.; SIKORSKA, J.; STRZEZEK, J. The effect of storing boar semen at 15-18 °C for varying lengths of time on morphology and biological value of spermatozoa. *Medicin Wet*, v.37, p.687-690, 1981.
- TONIOLLI, R. Pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation. Université François Rabelais de Tours - France, These de Doctorat 91p., 1996. (cópia da Tese na Biblioteca da Universidade Estadual do Ceará). Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsi dt=182303>.

- TONIOLLI, R. Morfologia dos espermatozoides de suínos, diluídos no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do ácido-3-indol acético. *Ciência Animal*, v.9, p.61-65, 1999.
- TONIOLLI, R.; JATAHY, P.C.; SILVA, M.C.; MOREIRA, F.R.C. Utilização do leite desnatado e do ácido 3-indol acético na conservação do sêmen suíno. *Ciência Animal*, v.11, n.1, p.21-26, 2001.
- Toniolli, r; Silva, m.c.; Chaves, r.n. Utilização de diferentes meios de ressuspensão para o sêmen do varrão após descongelação. *Revista brasileira de Ciência Veterinária*, v.16, n.01, p.41-45, 2009.
- VALE FILHO, V.R. Patologia do sêmen-diagnóstico andrológico e classificação do *Bos Taurus* e *Bos Indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutor em condições de Brasil. De um estudo de 1088 touros. UFMG – Escola de veterinária, 2ª ed., 1980.
- WABERSKI, D., DIRKSEN, G., WEITZE, K.F., LEIDING, C.; HAHN, R. Spermienmotilität und-morphologie in ihrer auswirkung auf die fruchtbarkeit von besamungsebern in feldversuchen. *Tierärztl Praxis*, v.18, p.591-594, 1990.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WEITZE, K. Long-term storage of extender boar semen. In Johnson L.A., Rath D, editors. *Procedures for boar semen preservation II*, vol. 1. Berlin: Paul Parey Scientific Publishers. p.231-253, 1991.
- YAVETZ, H.; HAUSER, R.; YOGEV, L.; BOTCHAN, A.; LESSING, J.B.; HOMONNAI, Z.T.; PAZ, G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. *Andrology*, v.27, p.31-35, 1995.
- YI, Y.J.; IM, G.S.; PARK, C.S. Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrossome morphology and motility of frozen-thawed boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.74, p.187-194, 2002.