

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO CONSERVADO NOS DILUENTES ÁGUA DE COCO E BTS ADICIONADO DE GELATINA EM PÓ

(Evaluation of the quality of swine semen conserved in coconut Water-and BTS extenders added of powder gelatine)

Rebeca de Andrade PARENTE*; Lina Raquel Santos ARAÚJO;
Ingrid Barbosa de MENDONÇA; Ricardo TONIOLLI

Laboratório Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus do Itaperi, Fortaleza/CE.
CEP: 60.740-000. *E-mail: rebecadeandradep@hotmail.com

RESUMO

Para ser ter bons resultados utilizando a inseminação artificial, é necessário sêmen e diluente de boa qualidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão de diferentes concentrações da gelatina em pó no diluente água de coco, sobre a qualidade espermática do sêmen suíno. Foram coletados sêmen de três reprodutores, 1x/semana durante 13 semanas (n=39). Foi separado de cada ejaculado $1,75 \times 10^9$ spz, repartidos igualmente entre os tratamentos, a uma concentração de 35×10^6 spz/mL. Foram utilizados dois diluentes: o BTS e a ACP, acrescidos de gelatina em pó em diferentes concentrações: 0%, 1,5%, 3,0% e 4,5%. O BTS sem gelatina foi utilizado como grupo controle. O sêmen diluído foi conservado a 17 °C por 5 dias. Foram realizadas análises no dia da coleta e em todos os dias de conservação. Foi avaliado: vigor, motilidade; morfologia acrossomal; vitalidade espermática; resistência osmótica e no CASA. Os resultados de vigor e motilidade não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Para o teste de morfologia acrossomal e vitalidade espermática, houve uma diferença significativa entre os tratamentos no D2, sendo o BTS e o ACP sem adição de gelatina com melhores resultados. Para os resultados de resistência osmótica no dia D2 e D4, o BTS sem gelatina teve melhores resultados significativos comparados aos outros tratamentos ($p < 0,05$). Nas análises do CASA, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Este estudo demonstrou que o diluente BTS sem gelatina teve melhores resultados. A adição de gelatina e o uso do ACP não trouxeram benefícios na conservação de sêmen suíno.

Palavras-chave: Suíno, sêmen, diluentes, gelatina em pó.

ABSTRACT

To achieve good results using artificial insemination, good quality semen and extenders are needed. This work aimed to evaluate the effects of including different concentrations of powdered gelatine in coconut water diluent, on the sperm quality of swine semen. Semen was collected from three breeders, once a week for 13 weeks (n=39). From each ejaculate, $1,75 \times 10^9$ spz were separated and equally distributed between treatments, at a concentration of 35×10^6 spz/mL. Two diluents were used: BTS e ACP, plus powdered gelatin in different concentrations: 0%, 1.5%, 3.0%, and 4.5%. BTS without gelatin was used as the control group. The diluted semen was kept at 17 °C for 5 days. Analyses were performed on the collection day (D0) and on all days of storage. It was evaluated: vigor; motility; acrosomal morphology; sperm vitality; osmotic resistance and CASA. The results of vigor and motility showed no significant differences ($p < 0.05$). For the acrosomal morphology and sperm vitality test, there was a significant difference between treatments on D2, with BTS and ACP without the addition of gelatin showing the better results. For the results of osmotic resistance on day D2 and D4, BTS without gelatin showed significantly better results compared to the other treatments ($p < 0.05$). In the CASA analyses, the treatments did not present significant differences. This study demonstrated that the BTS extender without gelatin had better results. The addition of gelatine and the use of ACP did not provide benefits for swine semen conservation.

Keywords: Swine, semen, extenders, powdered gelatin.

INTRODUÇÃO

O uso da inseminação artificial (IA) na suinocultura tecnificada, tem sido uma prática rotineira, utilizando-se principalmente o sêmen diluído e conservado a 17 °C. Inúmeros são os

benefícios alcançados com o uso dessa biotécnica, que a tornou um importante instrumento para o aumento da produtividade de granjas suínolas comerciais (JOHNSON *et al.*, 2000).

Muitos trabalhos têm sido feitos com o objetivo de desenvolver novos diluentes de sêmen, como o uso de leite em pó (BARROS *et al.*, 2015) e da água de coco em pó (TONIOLLI *et al.*, 2010), bem como com o ácido 3-indol acético, um componente da água de coco (TONIOLLI *et al.*, 2001), como meios alternativos na conservação de sêmen de várias espécies, assegurando uma boa qualidade espermática a baixo custo. Outra prática comum, com essa mesma finalidade, é o uso de substâncias adicionadas aos diluentes, como antioxidantes (JEONG *et al.*, 2009), crioprotetores, aminoácidos (FAGUNDES *et al.*, 2010) e a gelatina em pó (CORCINI *et al.*, 2011; GHELLER *et al.*, 2017; BANDEIRA *et al.*, 2018).

A água de coco é uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fito-hormônios) e muito pouco fosfolípideo (LAGUNA, 1996). Sua composição básica é de 95,5% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C e do complexo B, além de sais minerais como o sódio, potássio, cálcio, magnésio manganês, ferro, zinco e cobre (ARAGÃO, 2002; CARVALHO *et al.*, 2006). Ela se caracteriza por sua alta quantidade de antioxidantes (NUNES e SALES, 1993; NUNES e SALGUEIRO, 1999), açúcar, vitaminas, eletrólitos, aminoácidos (YONG *et al.*, 2009) e aspectos físico-químicos que permitem a sobrevivência dos espermatozoides, tendo uma ação benéfica sobre a morfologia e motilidade espermática (BARROS e TONIOLLI, 2011).

A sedimentação espermática que ocorre durante o armazenamento de doses de sêmen, favorece o aparecimento de alterações que resultam em um aumento de concentrações metabólicas tóxicas. A adição da gelatina ao meio diluente, pode ser uma alternativa para se evitar ou minimizar esse problema (CORSINI *et al.*, 2011; LÓPEZ-URUEÑA *et al.*, 2016).

Pode ser observada uma melhora na motilidade e da viabilidade espermática, no sêmen de coelho, quando diluído em meio adicionado de gelatina (LÓPEZ-GAUTIUS *et al.*, 2005). Esse mesmo sêmen de coelho, quando colocado em um diluente para sêmen suíno, suplementado com gelatina, apresentou uma maior porcentagem de espermatozoides viáveis com acrossoma intacto, em relação ao grupo controle (NAGY *et al.*, 2002).

CORSINI *et al.* (2011) observaram uma diminuição na porcentagem de espermatozoides com morfologia normal, no sêmen diluído com Beltsville Tawing Solution (BTS), em relação ao sêmen diluído e suplementado com 1,5% de gelatina, demonstrando que a sua adição ao meio, ajudou a preservar por mais tempo a morfologia das células espermáticas.

A gelatina em pó adicionada ao sêmen diluído, permite uma melhor e mais uniforme distribuição dos espermatozoides no seu meio (PAULENZ *et al.*, 2010; CORCINI *et al.*, 2011; GHELLER *et al.*, 2017), bem como diminui as demandas metabólicas do movimento espermático, melhorando os parâmetros de motilidade e preservando a capacidade de fertilização do sêmen. Essas melhorias são atribuídas ao aumento da viscosidade do diluente, que mantém as células espermáticas em suspensão. Meios mais viscosos, como os suplementados com gelatina, dificultam um pouco a movimentação espermática e permitem uma distribuição mais uniforme das células (LÓPEZ-GAUTIUS *et al.*, 2005).

Um meio mais viscoso diminui a necessidade de se homogeneizar periodicamente as doses de sêmen, devido a diminuição da sedimentação celular, o que permite um melhor aproveitamento dos componentes do diluente pelos espermatozoides, minimizando a variação

do pH, protegendo as células da exposição a luz e do choque térmico (CORCINI *et al.*, 2011; GHELLER *et al.*, 2017). Esta última característica é muito importante, visto que o espermatozoide suíno é mais sensível ao choque térmico, uma vez que a relação colesterol:fosfolipídio da sua membrana plasmática é baixa (DE LEEUW *et al.*, 1990). Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo examinar os efeitos da inclusão de gelatina em pó em dois diferentes diluentes e quatro diferentes concentrações, sobre a qualidade espermática do sêmen suíno conservado a 17 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e coleta do sêmen

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE), cujo projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), com processo registrado sob o nº 7330026/2018 de março/2019 a fevereiro/2020, em 14 de novembro de 2018. O sêmen de três reprodutores, foi coletado uma vez por semana durante treze semanas (n=39), em manequim fixo, pela técnica da mão enluvada, em um recipiente com capacidade para 500mL, coberto com um filtro e protegido por envoltório térmico. Foram utilizados animais com idade variando entre 12 e 36 meses, em sistema rotineiro de coletas de sêmen, alojados em baias individuais, arraçoados uma vez ao dia com 2,5Kg de ração de reprodução e água à vontade.

Avaliação do Ejaculado *in natura*

Após a coleta, o ejaculado foi identificado e processado no laboratório, sendo utilizado o ejaculado total, após a separação e descarte da fração gelatinosa retida no filtro (HANCOCK e HOVELL, 1959). O sêmen *in natura* foi avaliado quanto ao volume (mL), concentração ($\times 10^6$ spz/mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz), vigor espermático (0 a 5 - TONIOLLI, 1996) e motilidade espermática (0 a 100% - MARTIN-RILLO *et al.*, 1996). Para as análises de vigor e motilidade, uma amostra de 15µL do sêmen *in natura* foi colocada entre lâmina e lamínula (24 x 24mm) para avaliação através da microscopia óptica em aumento de 200x. Estes exames serviram para a avaliação individual da qualidade do sêmen de cada reprodutor, sendo aproveitado apenas os ejaculados que apresentassem vigor $\geq 3,5$ e motilidade $\geq 85\%$.

Diluição do sêmen, adição da gelatina e conservação

Foi separado de cada ejaculado um total de $1,75 \times 10^9$ spz, repartidos igualmente entre os diferentes tratamentos, a uma concentração de 35×10^6 spz/mL. O volume final para cada tratamento (25mL = sêmen + diluente) foi repartido em tubos de ensaio com capacidade para 5mL (total de 175×10^6 spz/tubo), num total de 5 tubos/tratamento (1 tubo / dia de análise), que corresponderam, individualmente, a cada um dos dias de análise: D0 (dia da coleta), D1, D2, D3 e D4. De acordo com a concentração de cada ejaculado, volumes diferentes de diluente foram utilizados a fim de completar o volume final de cada tratamento.

Foram utilizados dois diluentes: Beltsville Thawing Solution (BTS) e a Água de coco em pó (ACP). O ACP é oriundo da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do *spray dry*, apresentado sob a forma de pó, sendo reconstituída com água destilada nas seguintes

proporções: pacote de 24g de ACP + 100mL de água destilada + benzilpenicilina G procaína, benzilpenicilina G benzatina, sulfato de dihidroestreptomicina a 80mg/100mL. No caso do BTS o preparo foi feito conforme orientação do fabricante, ou seja, pacotes de 50g para serem diluídos em 1 litro de água destilada.

A gelatina em pó, foi adicionada diretamente nos diluentes, em porcentagens pré-determinadas (0%, 1,5%, 3% e 4,5% de gelatina, Tab.01), após o preparo dos mesmos, que era feito adicionando-se quantidades fixas de água destilada ao produto na forma de pó.

Tabela 01: Diluentes e diferentes concentrações de gelatina em pó.

BTS	ACP
BTS + 0,0% de Gelatina	ACP + 0,0% de Gelatina
BTS + 1,5% de Gelatina	ACP + 1,5% de Gelatina
BTS + 3,0% de Gelatina	ACP + 3,0% de Gelatina
BTS + 4,5% de Gelatina	ACP + 4,5% de Gelatina

Os diluentes eram preparados no dia da coleta. Os dois diluentes (BTS e ACP), após ressuspensão em água destilada, eram deixados em repouso durante 60 minutos em banho maria a 30 °C, antes de serem utilizados para diluição do sêmen. Após o recebimento do ejaculado no laboratório e processadas as primeiras análises, o sêmen *in natura* era também colocado em banho-maria a 30 °C, durante 15 minutos, antes da sua diluição. Após esse período de repouso, cada alíquota de sêmen, de cada tratamento, foi diluída nos dois diluentes testados, distribuídos em 05 tubos (3,0mL/tubo) que representava cada dia de análise, em seguida transferidos para a geladeira entre 15 a 17 °C, permanecendo assim por cinco dias (D0 a D4).

Análises do sêmen após conservação

A cada dia de análise, um tubo de ensaio referente a cada ejaculado/tratamento, era reaquecido em banho maria a 37 °C por 10 minutos. Ao final desse tempo, eram feitas as seguintes análises: vigor espermático, motilidade espermática, taxa média de degradação da motilidade (TDM), integridade acrossomal, vitalidade espermática (% células vivas), teste de resistência osmótica e avaliação computadorizada da motilidade espermática. Toda amostra de sêmen, em todos os tratamentos, antes de qualquer tipo de análise, reaquecida em banho maria a 37 °C por 10 minutos e posteriormente homogeneizada, através de movimentos leves do tubo de ensaio.

Vigor espermático e motilidade espermática

Para avaliar a qualidade espermática foi analisado o vigor espermático (0 a 5) (TONIOLLI, 1996) e a porcentagem de espermatozoides móveis (motilidade espermática - 0 a 100%) (MARTIN-RILLO *et al.*, 1996). Para as duas análises colocou-se uma gota de sêmen de 15µL, entre lâmina e lamínula, com avaliação no mínimo de três campos do microscópio, em aumento de 200x. As análises destas características foram realizadas todos os dias, durante todo o período de conservação do sêmen (D0, D1, D2, D3 e D4).

Taxa média de degradação da motilidade

As análises para o teste de termorresistência foram feitas nos dias D0, D2 e D4 de conservação, consistindo na incubação do sêmen a 37 °C durante 2 horas, com leituras do vigor

espermático aos 10 e 120 minutos de incubação. Aos resultados aplicou-se uma fórmula matemática, no intuito de calcular a taxa de degradação média da motilidade (TDM):

$$\text{TDM} = \frac{\text{vigor 10 min.} - \text{vigor 120 min.}}{\text{vigor 10 min.}} \times 100 = (\%)$$

Integridade acrossomal e vitalidade espermática

Esse exame foi realizado nos dias D0, D2 e D4 de conservação do sêmen sendo o mesmo incubado a 37 °C por 10min antes de cada análise. Foram avaliadas duas características (integridade da membrana acrossomal e a quantidade de células vivas) na mesma lâmina, através de esfregaços de sêmen corados pela solução de azul de bromofenol, composta de: azul de bromofenol (0,1g); citrato de sódio (0,4g); água destilada (10mL) e se trata de uma coloração vital, separando células vivas de mortas (MEDEIROS *et al.*, 2006). Para preparo do esfregaço, juntou-se uma gota de sêmen (15µL) com outra de corante (15µL), estando as duas a 37 °C e em seguida homogeneizou-se. Após 30 segundos, retirou-se uma gota (30 µL) desta mistura e procedeu-se ao esfregaço, deixando secar à temperatura ambiente (25 °C) antes das análises (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

Para esta análise foi feita a contagem de 200 células/lâmina em microscopia óptica com lente de imersão (1000x). Segundo a morfologia do acrossoma e vitalidade, 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 (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

Teste de resistência osmótica

Esse teste teve por finalidade avaliar a funcionalidade da membrana espermática, tendo sido realizado nos dias D0, D2 e D4 de conservação do sêmen. Essa técnica consiste em adicionar 0,5mL de sêmen diluído em 7,5mL de água destilada, mantendo a mistura em banho-maria a 37 °C por 15 minutos (solução 1). Após este período, em 1mL da solução 1, foi adicionado 0,5mL de formol salino a 1% (solução 2). Da solução 2, foi retirada uma alíquota de 15µL, colocada em uma lâmina, recoberta por lamínula, em seguida levada ao microscópio óptico, com um aumento de 400x, sendo contado um total de 200 células/lâmina (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

Para avaliação das células, foi observada a cauda, onde os espermatozoides com cauda reta indicavam uma perda de função na membrana (espermatozoide não reativo) e os que apresentavam diferentes níveis de enrolamento e/ou dobramento da cauda, eram classificados como membrana funcional (espermatozoide reativo). Considera-se um bom sêmen aquele que apresente no mínimo 50% de espermatozoides com algum nível de cauda enrolada e/ou dobrada (BARIL *et al.*, 1993).

Avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA)

A análise de sêmen assistida por computador (CASA) é considerada como um sistema automatizado para visualizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide (AMANN e KATZ, 2004).

Nos dias D0, D2 e D4 de conservação realizou-se a análise assistida de sêmen por computador (CASA) através do *Software Sperm Class Analyser*[®] (SCA 2002, Microptic, Barcelona, Espanha). Para essa avaliação, as amostras de sêmen foram retiradas da geladeira a 17 °C e colocadas em banho maria a 37 °C por 10 minutos. Após esse tempo, foi retirada uma alíquota de 15µL de cada tratamento, colocadas na câmara de makler, aquecida a 37 °C em uma placa e assim avaliada pelo sistema em cinco campos distintos. Quando necessário foi feito a limpeza de imagens, utilizando-se a configuração preconizada para suínos no sistema SCA (KARAGEORGIOU *et al.*, 2016). Os parâmetros avaliados no CASA estão no quadro 01:

Quadro 01: Parâmetros da motilidade espermática obtidos por meio do CASA

Parâmetro	Sigla	Descrição
Velocidade curvilinear	VCL (µm/s)	Velocidade da trajetória real do espermatozoide
Velocidade média da trajetória	VAP (µm/s)	Velocidade da trajetória média do espermatozoide
Velocidade linear progressiva	VSL (µm/s)	Velocidade em função da linha reta entre o primeiro e último ponto da trajetória do sptz.
Linearidade	LIN (%)	Relação percentual entre VSL e VCL
Retilinearidade	STR (%)	Relação percentual entre VSL e VAP
Index de oscilação	OSC (%)	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça	ALH (µm)	Deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real
Frequência de batimento cruzado	BCF (Hz)	Frequência que a cabeça do espermatozoide atravessa a trajetória média.
Oscilação ou equilíbrio	WOB (%)	Medida da progressão pela oscilação / equilíbrio.

(Fonte: BOYER *et al.*, 1989; VERSTENGEN *et al.*, 2002)

Análise Estatística

O presente trabalho foi conduzido sob um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo distribuído em blocos ao acaso. Os dados quantitativos com distribuição normal foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o Programa Estatístico R (The R Foundation for Statistical Computing, 2018). Todos os testes foram realizados com um índice de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados no experimento 39 ejaculados, que apresentaram na sua forma *in natura* aspecto normal, coloração branco leitosa e que apresentaram os seguintes valores médios: volume de 262mL, concentração de $604,5 \times 10^6$ sptz/mL, motilidade espermática (%) de 93 ± 2 e vigor espermático de $4,6 \pm 0,6$. Eles se apresentaram dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie suína (CBRA, 2013), sendo dessa forma utilizados nos protocolos experimentais. A característica vigor espermático (Tab. 02), foi analisada durante todos os dias de conservação do sêmen e não apresentou diferenças significativas entre os resultados,

comparando-se os diferentes diluentes e as diversas concentrações de gelatina em pó, utilizadas ($p>0,05$).

Tabela 02: Vigor espermático (0 a 5) do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Tratamentos		Dias de Conservação				
		D0	D1	D2	D3	D4
BTS	0,0%	3,5±0,9 ^{Aa}	2,6±1,0 ^{aB}	1,4±1,2 ^{aC}	0,6±1,1 ^{aD}	0,3±0,6 ^{aD}
	1,5%	3,6±0,5 ^{aA}	2,7±1,0 ^{aB}	1,4±1,2 ^{aC}	0,7±1,1 ^{aD}	0,3±0,7 ^{aD}
	3,0%	3,6±0,6 ^{aA}	2,9±0,9 ^{aB}	2,1±1,1 ^{aC}	0,8±1,2 ^{aD}	0,3±0,8 ^{aD}
	4,5%	3,5±0,8 ^{aA}	2,7±1,1 ^{aB}	1,5±1,3 ^{aC}	0,7±1,2 ^{aD}	0,4±1,0 ^{aD}
ACP	0,0%	3,4±0,7 ^{aA}	2,1±1,0 ^{aB}	0,2±0,5 ^{aC}	0,1±0,3 ^{aC}	0,0±0,0 ^{aC}
	1,5%	3,2±0,7 ^{aA}	1,9±1,2 ^{aB}	0,4±0,8 ^{aC}	0,1±0,2 ^{aC}	0,0±0,0 ^{aC}
	3,0%	3,5±0,5 ^{aA}	2,7±0,9 ^{aB}	1,0±1,0 ^{aC}	0,1±0,5 ^{aD}	0,0±0,0 ^{aD}
	4,5%	3,5±0,6 ^{aA}	1,9±1,3 ^{aB}	0,3±0,6 ^{aC}	0,1±0,3 ^{aC}	0,0±0,0 ^{aC}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas ($p<0,05$).

No presente estudo, os resultados do ACP e do BTS, sem gelatina, não apresentaram diferenças significativas durante todo o período de conservação ($p>0,05$). A partir de D2, os resultados de vigor espermático no ACP, apresentaram uma forte queda nos seus valores ($D2=0,2$). Os resultados encontrados nesse trabalho, corroboram com os de Toniolli *et al.* (2010), no qual comparando vigor espermático do sêmen diluído nos mesmos diluentes, não encontrou diferenças significativas, durante o período de conservação.

Mesmo o ACP já tendo apresentado bons resultados nas primeiras 24 horas quando utilizado na diluição do sêmen suíno (DIAS *et al.*, 2019), no presente estudo não se pode colocar em evidência a ação benéfica desse diluente. Apesar de não ter diferenças significativas as quedas dos valores de vigor foram mais acentuadas no diluente ACP. De acordo com os resultados, o diluente BTS com adição de 3% de gelatina, pode ser usado até o dia D2 de conservação, com bons valores de vigor espermático.

As quedas de valores no D1 foram mais acentuadas no ACP (2,1) do que no BTS (2,6), o que proporcionou o uso por mais tempo do BTS com possibilidade de bons resultados de fertilidade. Já o diluente ACP pode ser usado nas primeiras 24 horas ou no dia da diluição.

Na motilidade espermática (Tab. 03), considerando-se os valores no diluente ACP sem gelatina, verificou-se uma queda acentuada a partir de D1 (47,1%). Esse resultado pode ter sido devido a uma produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs), a qual leva o espermatozoide a um maior estresse oxidativo, com consequente diminuição da sua motilidade. Essa é uma das razões que podem explicar a diminuição da motilidade do sêmen entre os dias de conservação (MORAES *et al.*, 2015). Altas taxas de EROs afetam as funções mitocondriais e, consequentemente a motilidade espermática (DIAS *et al.*, 2019).

Para a característica motilidade espermática, o diluente BTS, com ou sem adição da gelatina, apresentou valores médios maiores quando comparado ao ACP, a partir de D1 até o final do período de conservação do sêmen. Os tratamentos utilizando esses dois diluentes conseguiram conservar valores aceitáveis de motilidade até o segundo dia de conservação (D1).

A partir de D2, não seria aconselhável, à luz dos valores da motilidade espermática, a utilização de tal sêmen em programas de inseminação artificial (TONIOLLI e MOREIRA, 2008).

Tabela 03: Motilidade espermática (%) do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Tratamentos		Dias de Conservação				
		D0	D1	D2	D3	D4
BTS	0,0%	71,4±19 ^{aA}	55,3±24 ^{aB}	31,6±25 ^{aC}	11,4±21 ^{aD}	5,4±13 ^{aD}
	1,5%	76,9±7 ^{aA}	53,6±23 ^{aB}	27,2±25 ^{aC}	13,6±22 ^{aD}	7,2±16 ^{aD}
	3,0%	76,3±9 ^{aA}	60,5±20 ^{aB}	39,5±24 ^{aC}	15,5±25 ^{aD}	5,6±15 ^{aD}
	4,5%	73,5±14 ^{aA}	55,6±23 ^{aB}	29,2±27 ^{aC}	13,3±24 ^{aD}	7,9±19 ^{aD}
ACP	0,0%	73,5±10 ^{aA}	47,1±20 ^{aB}	4,6±11 ^{aC}	1,0±3,8 ^{aC}	0,0±0,0 ^{aC}
	1,5%	71,5±11 ^{aA}	41,5±25 ^{aB}	9,6±19 ^{aC}	1,3±5,7 ^{aC}	0,0±0,0 ^{aC}
	3,0%	76,0±0,5 ^{aA}	57,9±16 ^{aB}	20,0±21 ^{aC}	2,3±11 ^{aD}	0,0±0,0 ^{aD}
	4,5%	72,6±0,6 ^{aA}	41,0±25 ^{aB}	7,9±15 ^{aC}	1,8±9,7 ^{aC}	0,0±0,0 ^{aC}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas ($p<0,05$).

Os valores médios da motilidade espermática entre os diluentes testados, adicionados de 3% de gelatina, apresentaram quedas maiores no ACP, a partir de D1, até o final do período de conservação do sêmen, apesar das diferenças não terem sido estatisticamente significativas entre os dois diluentes ($p>0,05$). Esses resultados estão de acordo com os de Corcini *et al.* (2011), que utilizaram metodologia similar, com sêmen de suíno e o diluente BTS, adicionado de gelatina nas concentrações de 1,5% e 3,0%. Esses autores não tiveram diferenças significativas nos seus resultados de motilidade ($p>0,05$). Já em estudos feitos com sêmen de carneiro utilizando diluente a base de glicose e frutose (YANIZ *et al.*, 2005) e sêmen de coelho com diluente a base de leite (LÓPEZ-GAUTIUS *et al.*, 2005), o tratamento suplementado com gelatina apresentou melhores resultados de motilidade, quando comparados aos diluentes sem adição de gelatina. As diferenças de resultados podem ter sido devido a características inerentes a cada espécie e diluente, diferentes das utilizadas no presente trabalho.

No presente estudo o BTS adicionado de 3% de gelatina apresentou os melhores resultados, entretanto, sem diferenças significativas. Sendo indicado o uso de BTS com ou sem gelatina até o D1 e o ACP com ou sem gelatina no dia da diluição do sêmen.

A acidificação do local de aglutinação espermática no meio diluente, causada pelas modificações do pH, em consequência do aumento da concentração de produtos tóxicos do metabolismo espermático, pode trazer prejuízos para a motilidade do espermatozoide (NAGY *et al.*, 2002). A sedimentação ocorre quando a dose de sêmen fica em repouso no período de armazenamento, necessitando assim fazer frequentes homogeneizações, pois na sedimentação celular ocorre o acúmulo de metabólitos e diminui a eficácia dos tampões (MENEGAT, 2016).

Em doses de sêmen adicionadas da gelatina em pó, não é necessário se fazer a homogeneização, uma vez que não ocorre a sedimentação celular e o sistema tampão do diluente, consegue controlar o pH do meio com uma maior eficácia. Com isso observou-se que o diluente BTS com gelatina teve mais êxito no controle do pH, uma vez que ele apresentou melhores médias de motilidade. Os tratamentos utilizando ACP como diluente não obtiveram

o mesmo êxito, fato esse que pode ser explicado pela falha dos tampões do diluente ACP, que não conseguiram regular bem o pH do meio.

Para a característica taxa de degradação média da motilidade (TDM), pode-se observar que também não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tab. 04). Observou-se que o diluente BTS, adicionado 3% de gelatina (D0=46,3; D2=58,1; D4=93,2), apresentou uma menor TDM, quando comparado a todos os outros tratamentos na presença da gelatina. Isso pode ser atribuído ao fato de que diluentes suplementados com gelatina, permitem uma melhor homogeneização das células espermáticas no meio diluente, proporcionando um melhor contato das mesmas com os componentes do diluente (BANDEIRA *et al.*, 2018) e permitindo uma melhor manutenção da motilidade espermática. Quando se compara os resultados dos tratamentos utilizando BTS com o ACP, os primeiros obtiveram no geral uma menor taxa de degradação de motilidade.

Tabela 04: Taxa de degradação da motilidade (%). do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Tratamentos		Dias de Conservação		
		D0	D2	D4
BTS	0,0%	31,0±18,2 ^{aA}	63,1±37,0 ^{aB}	94,1±21,5 ^{aC}
	1,5%	48,7±13,9 ^{aA}	74,1±31,4 ^{aB}	97,9±9,5 ^{aC}
	3,0%	46,3±19,0 ^{aA}	58,1±32,9 ^{aA}	93,2±21,5 ^{aB}
	4,5%	47,8±18,1 ^{aA}	63,7±35,5 ^{aB}	88,5±27,1 ^{aC}
ACP	0,0%	47,6±20,8 ^{aA}	94,2±21,0 ^{aB}	100±0,0 ^{aB}
	1,5%	62,8±15,7 ^{aA}	89,7±28,5 ^{aB}	100±0,0 ^{aC}
	3,0%	69,6±15,6 ^{aA}	82,7±27,2 ^{aB}	100±0,0 ^{aC}
	4,5%	66,3±7,6 ^{aA}	93,6±23,5 ^{aB}	100±0,0 ^{aB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas (p<0,05).

Para a avaliação de espermatozoides vivos e com acrossomo intacto, no primeiro (D0) e no quinto dia de conservação (D4) não houve diferenças significativas entre os tratamentos (p>0,05) (Tab. 05).

Tabela 05: Total de espermatozoides vivos /acrossomo intacto (%) do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Tratamento		Dias de Conservação		
		D0	D2	D4
BTS	0,0%	67,9±3,5 ^{aA}	65,0±1,7 ^{aB}	62,2±4,6 ^{aC}
	1,5%	66,2±3,2 ^{aA}	63,7±2,5 ^{bB}	61,9±4,1 ^{aC}
	3,0%	65,7±3,3 ^{aA}	63,8±3,2 ^{bB}	62,7±4,4 ^{aC}
	4,5%	64,5±2,8 ^{aA}	61,4±2,8 ^{cB}	60,4±4,0 ^{aC}
ACP	0,0%	66,5±2,5 ^{aA}	64,8±1,4 ^{aB}	61,5±3,9 ^{aC}
	1,5%	65,5±2,4 ^{aA}	63,1±3,3 ^{bB}	61,1±4,1 ^{aC}
	3,0%	64,9±2,7 ^{aA}	62,5±2,6 ^{bB}	61,3±3,6 ^{aC}
	4,5%	64,2±2,3 ^{aA}	59,7±2,8 ^{eB}	58,5±3,9 ^{aC}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas (p<0,05).

No terceiro dia (D2), observou-se um maior percentual de espermatozoides vivos com acrossomo intacto nos diluentes (BTS e ACP) sem gelatina quando comparado aos diluentes acrescidos das diferentes concentrações de gelatina ($p < 0,05$). Um estudo feito por Tonioli *et al.* (2010) utilizando sêmen suíno, observou-se que o ACP sem gelatina obteve melhor porcentagem de espermatozoides vivos com acrossomo intacto quando comparado ao BTS.

Os menores percentuais de células vivas com acrossomo intacto foram observados em D2, nas amostras conservadas em meio com 4,5% de gelatina, independente do diluente utilizado (BTS=61,4% e ACP=59,7% - $p < 0,05$). Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, Nagy *et al.* (2002) observaram um maior percentual de espermatozoides vivos com acrossomo intacto no sêmen de coelho conservado em diluente adicionado de gelatina, no entanto, esses autores adotaram temperatura de conservação inferior à convencional, revelando um possível efeito protetor da gelatina contra o choque pelo frio.

Em D2 teve uma diferença significativa muito alta ($p > 0,001$). No D0 não houve diferenças significativas ($p < 0,05$), o dia D4 também não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), porém já haviam passado cinco dias de conservação, o que fez com que a ação do tempo influenciasse nas características das células, associado ao número baixo de repetições ($n=39$). Isso pode explicar o fato de D2 apresentar diferenças significativas, D0 e D4 não.

Em D4 não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). A adição de gelatina não demonstrou ter nenhum benefício sobre a porcentagem de células vivas e acrossomo intacto. Os diluentes BTS e ACP sem adição de gelatina podem ser utilizados até o final do período de incubação.

No teste hiposmótico a gelatina adicionada aos diluentes BTS e ACP nas diferentes concentrações, não apresentou efeitos benéficos sobre a manutenção da funcionalidade da membrana espermática. Pode-se observar que, independentemente do diluente, com o passar do tempo de armazenamento, a funcionalidade da membrana espermática, mensurada pelo teste hiposmótico, diminuiu (Tab. 06). Essa diminuição, normalmente acontece devido à ação dos produtos do metabolismo espermático, conforme descrito por Oliveira Neto (2012).

Tabela 06: Funcionalidade de membrana (teste hiposmótico, %) do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservados a 17 °C por cinco dias.

Tratamento		Dias de Conservação		
		D0	D2	D4
BTS	0,0%	70,9±7,5 ^{aA}	65,3±5,7 ^{aB}	62,9±3,6 ^{aC}
	1,5%	61,9±6,7 ^{aA}	61,3±5,5 ^{bA}	60,7±2,6 ^{bA}
	3,0%	62,0±5,1 ^{aA}	59,7±5,3 ^{bdB}	59,0±3,1 ^{bB}
	4,5%	62,8±6,5 ^{aA}	58,0±6,7 ^{cdB}	56,9±2,4 ^{dB}
ACP	0,0%	67,5±10,2 ^{aA}	60,1±6,1 ^{bcdB}	59,6±2,6 ^{cB}
	1,5%	60,8±5,3 ^{aA}	60,2±4,8 ^{bdA}	59,3±2,2 ^{cC}
	3,0%	61,3±4,6 ^{aA}	58,5±3,7 ^{dB}	57,6±3,0 ^{Dc}
	4,5%	61,4±4,4 ^{aA}	55,2±8,0 ^{eB}	54,7±2,3 ^{eC}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos dias de análise D2 e D4, o diluente BTS sem adição de gelatina foi superior aos outros tratamentos ($p<0,05$). Enquanto o diluente ACP acrescido de 4,5% de gelatina apresentou os menores percentuais de células reativas ao teste hiposmótico indicando possível efeito deletério sobre a funcionalidade da membrana espermática. Pode-se observar em D4 que independente do diluente, com o aumento da concentração de gelatina, notamos que houve uma diminuição na porcentagem de células com membrana funcional. Ou seja, nem o ACP e nem a adição de gelatina produziram efeitos benéficos sobre a funcionalidade da membrana.

Os resultados deste trabalho assemelham-se com os resultados apresentados no trabalho de Dias *et al.* (2019), onde o diluente BTS sem gelatina foi melhor do que o ACP sem adição de gelatina ($p<0,05$). E discorda de um estudo feito por Toniolli *et al.* (2010), que o ACP sem adição de gelatina obteve resultados significativamente melhores, quando compara ao BTS sem adição de gelatina, durante o mesmo período de tempo ($p<0,05$).

No dia de conservação D0 não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). Após o período de conservação (D4), pode-se observar que o diluente BTS sem adição de gelatina (62,9) apresentou maior proteção e melhor meio aos espermatozoides, uma vez que ele obteve maior número de células com membrana funcional.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o sêmen diluído em ACP sem adição de gelatina pode ser utilizado nas primeiras 24 horas sem prejuízos. O BTS sem adição de gelatina proporciona melhores condições de proteção as células espermáticas, o que permite que o sêmen chegue ao final do período de incubação com um maior número de células com membrana funcional, este fato pode influenciar positivamente resultados de fertilidade.

Segundo as análises obtidas através do CASA das variáveis VCL, VSL e VAP do sêmen suíno conservado em diluentes acrescidos de diferentes concentrações de gelatina, não foram observadas diferenças estatísticas nos três dias de análises entre todos os tratamentos (Figs. 01, 02 e 03).

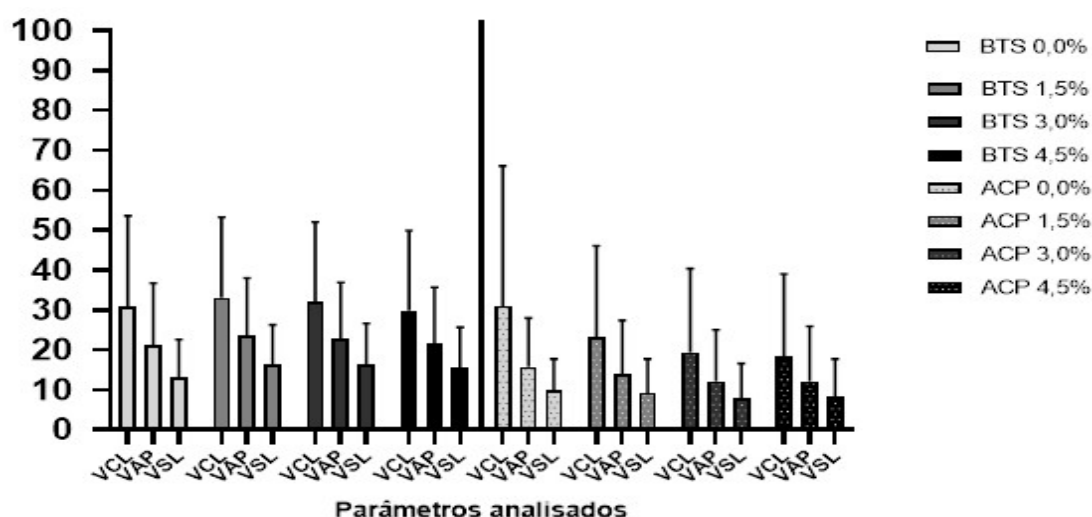


Figura 01: Avaliação espermática pelo CASA, no D0 de conservação do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Obs.: VCL (Velocidade curvilínea), VAP (Velocidade média da trajetória), VSL (Velocidade linear progressiva).

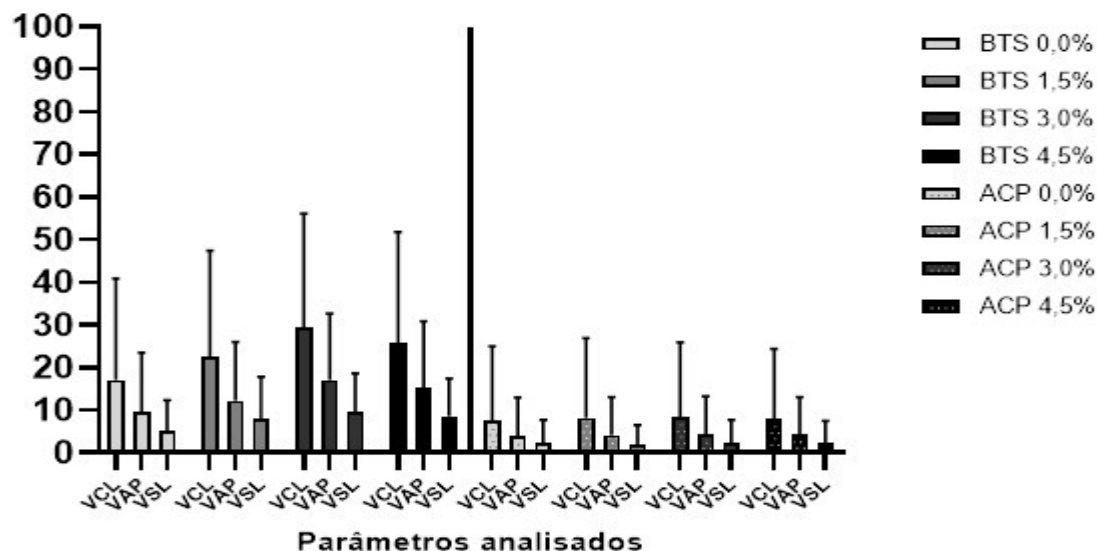


Figura 02: Avaliação espermática pelo CASA, no D2 da conservação do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Obs.: VCL (Velocidade curvilínea), VAP (Velocidade média da trajetória), VSL (Velocidade linear progressiva).

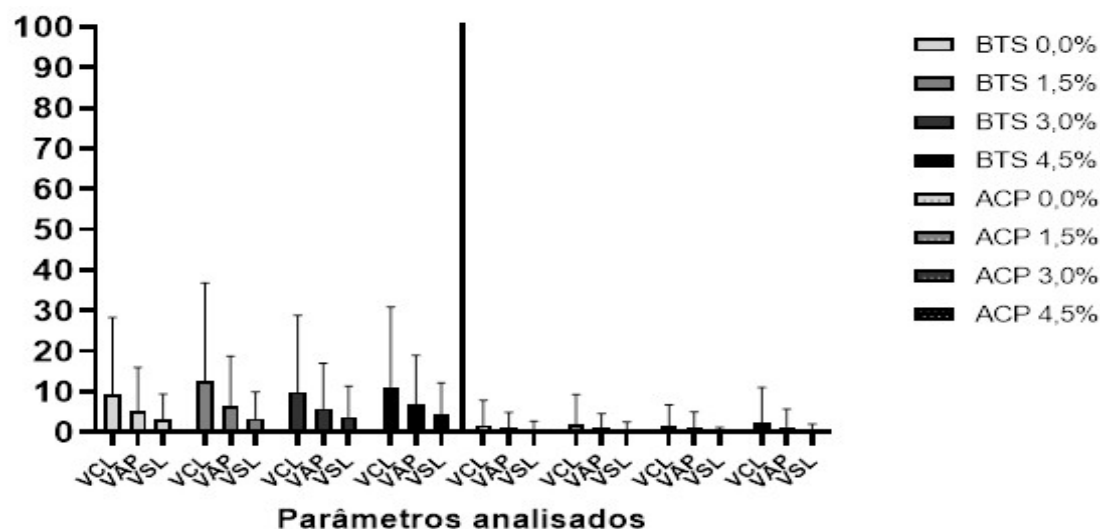


Figura 03: Avaliação espermática pelo CASA, no D4 da conservação do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Obs.: VCL (Velocidade curvilínea), VAP (Velocidade média da trajetória), VSL (Velocidade linear progressiva).

No presente estudo os resultados de VAP foram numericamente maiores que os de VSL, durante todo o período de conservação, para todos os tratamentos. Isso demonstrou que o espermatozoide fez trajetórias irregulares, com grau mais alto de movimento lateral, o que persistiu por todos os dias de conservação (Figs. 01, 02 e 03).

Não foram observadas diferenças estatísticas em relação às variáveis ALH, BCF, STR, LIN e WOB ($p > 0,05$) ao se comparar o sêmen suíno conservado em diluentes acrescidos de diferentes concentrações de gelatina (Tabs. 07, 08 e 09).

Tabela 07: Avaliação espermática pelo CASA no D0 da conservação do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Tratamentos		Parâmetros				
		LIN	STR	WOB	ALH	BCF
BTS	0,0%	32,1±23 ^{aA}	45,6±31 ^{aA}	49,6±32 ^{aA}	1,6±1,2 ^{aA}	5,0±3,4 ^{aA}
	1,5%	38,9±24 ^{aA}	53,2±30 ^{aA}	56,0±31 ^{aA}	1,7±1,0 ^{aA}	5,6±3,2 ^{aA}
	3,0%	38,2±24 ^{aA}	52,9±32 ^{aA}	53±32 ^{aA}	1,7±1,1 ^{aA}	5,4±3,3 ^{aA}
	4,5%	37,8±25 ^{aA}	51,5±33 ^{aA}	52,0±33 ^{aA}	1,6±1,1 ^{aA}	5,2±3,3 ^{aA}
ACP	0,0%	27,4±20 ^{aA}	44,2±31 ^{aA}	42,0±29 ^{aA}	1,6±1,4 ^{aA}	4,4±3,7 ^{aA}
	1,5%	24,8±23 ^{aA}	39,9±34 ^{aA}	36±31 ^{aA}	1,3±1,3 ^{aA}	3,8±3,6 ^{aA}
	3,0%	21,9±23 ^{aA}	34,2±34 ^{aA}	32±32 ^{aA}	1,1±1,3 ^{aA}	3,2±3,7 ^{aA}
	4,5%	23,3±25 ^{aA}	34,7±36 ^{aA}	32±34 ^{aA}	1,1±1,3 ^{aA}	3,5±4,0 ^{aA}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 08: Avaliação espermática pelo CASA no D2 da conservação do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservado a 17 °C por cinco dias.

Tratamentos		Parâmetros				
		LIN	STR	WOB	ALH	BCF
BTS	0,0%	10,7±14 ^{aB}	18,9±25 ^{aB}	20,3±27 ^{aB}	1,1±1,6 ^{aAB}	3,8±10,7 ^{aB}
	1,5%	15,1±16 ^{aB}	26,8±28 ^{aB}	27,0±29 ^{aB}	1,3±1,6 ^{aAB}	3,5±4,0 ^{aB}
	3,0%	19,2±17 ^{aB}	33,1±28 ^{aB}	34±30 ^{aB}	1,6±1,5 ^{aA}	4,1±3,7 ^{aA}
	4,5%	17,3±18 ^{aB}	28,5±29 ^{aB}	31±31 ^{aB}	1,4±1,6 ^{aA}	3,5±3,7 ^{aAB}
ACP	0,0%	6,1±14 ^{aB}	10,4±22 ^{aB}	10,0±24 ^{aB}	0,5±1,2 ^{aB}	1,0±2,5 ^{aB}
	1,5%	5,8±12 ^{aB}	10,3±21 ^{aB}	11,2±22 ^{aB}	0,4±1,1 ^{aB}	0,8±2,3 ^{aB}
	3,0%	6,4±15 ^{aB}	11,2±23 ^{aB}	11,1±22 ^{aB}	0,4±1,2 ^{aB}	0,8±2,2 ^{aB}
	4,5%	7,4±16 ^{aB}	11,7±23 ^{aB}	14±27 ^{aB}	0,4±1,3 ^{aB}	0,7±2,1 ^{aB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 09: Avaliação espermática pelo CASA no D4 da conservação do sêmen suíno diluído em BTS e ACP, adicionado de diferentes concentrações de gelatina em pó e conservados a 17 °C por cinco dias.

Tratamento		Parâmetros				
		LIN	STR	WOB	ALH	BCF
BTS	0,0%	6,8±14,1 ^{aB}	11,8±23,8 ^{aB}	11,7±23,5 ^{aB}	0,6±1,2 ^{aB}	1,5±3,0 ^{aB}
	1,5%	6,1±12,4 ^{aB}	11,5±21,9 ^{aC}	12,0±22,7 ^{aB}	0,8±1,6 ^{aB}	1,5±2,9 ^{aC}
	3,0%	9,2±19,4 ^{aB}	14,5±27,9 ^{aC}	13,9±26,9 ^{aC}	0,4±1,0 ^{aB}	1,3±2,9 ^{aB}
	4,5%	10,2±18,5 ^{aB}	16,4±28,7 ^{aB}	15,8±27,6 ^{aB}	0,7±1,3 ^{aB}	1,9±3,4 ^{aB}
ACP	0,0%	2,5±8,7 ^{aB}	4,0±14,3 ^{aB}	4,7±16,6 ^{aB}	0,0±0,0 ^{aB}	0,0±0,0 ^{aB}
	1,5%	2,4±9,1 ^{aB}	4,0±14,8 ^{aB}	4,5±16,4 ^{aB}	0,0±0,2 ^{aB}	0,0±0,3 ^{aB}
	3,0%	1,1±4,8 ^{aB}	1,4±6,0 ^{aB}	5,7±20,4 ^{aB}	0,0±0,0 ^{aB}	0,0±0,0 ^{aB}
	4,5%	1,4±5,0 ^{aB}	2,8±9,7 ^{aB}	4,0±14,3 ^{aB}	0,0±0,0 ^{aB}	0,0±0,0 ^{aB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferenças significativas (p<0,05).

CONCLUSÕES

A adição da gelatina em pó aos diluentes BTS e ACP, na conservação do sêmen suíno, visando uma melhor conservação de sêmen, não apresentou resultados que possam justificar a sua utilização. Maiores estudos nesse sentido, com relação a sua utilização no sêmen do varrão, são necessários, para uma verificação mais detalhada dessa possibilidade.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ARAGÃO, W.M. **Coco pós-colheita**. Aracaju/SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 76p. (Embrapa Informação Tecnológica).
- BANDEIRA, A.M.P.; MATOS, J.E.; MARIA, A.N.; CARNEIRO, P.C.F.; PURDY, P.H.; AZEVEDO, H.C. The effects of gelatin supplementation prior to cooling on ram semen quality and fertility. **Animal Reproduction**, v.15, n.1, p.23-28, 2018.
- BARIL, G.; CHEMINEAU, Y.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins**. 3. ed., Nouzilly, INRA, 216, 1993.
- BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.400-407, 2011.
- 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, supl.1, p.2023-2030, 2015.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. **Suinocultura em ação: Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada**. 1. ed., Porto Alegre: Brasil, 2005.
- BOYER, M.; ROUSTAN, C.; BENYAMIN, Y. DNase I—actin complex: An immunological study. **Bioscience Reports**, v.5, p.39–46, 1989.
- CARVALHO, J.M.C.; MAIA, G.A.; SOUZA, P.H.M.; MAIA, G.A.J. Água de coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Ciência Agropecuária**, v.27, p.437-452, 2006.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3. ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CORCINI, C.D.; MOREIRA, F.; PIGOZZO, R.; VARELA, JR.A.S.; TORRES, N.U.; LUCIA, J.R.T. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. **Livestock Science**, v.138, n.1/3, p.289-292, 2011.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-183, 1990.

DIAS, A.V.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S.; CANTANHÊNDE, L.F.; BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso de diluentes alternativos e do ácido fítico adicionado ao sêmen suíno conservado. **Ciência Animal**, v.29, n.3, p.22-37, 2019.

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.

GHELLER, S.M.M.; CORCINI, C.D.; PRADIEÉ, J.; RIZZOTO, G.; LUCIA, T.; MOREIRA, F.; VARELA, A.S. Gelatin protects ram semen stored for 72 hours at 5 °C. **Small Ruminant Research**, v.158, p.54-56, 2017.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.492-504, 2005.

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, n.2, p.181-189, 2009.

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

KARAGEORGIU, M.A.; TSOUSIS, G.; BOSCOS, C.M.; TZIKA, E.D.; TASSIS, P.D.; TSAKMAKIDIS, I.A. A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. **Acta Veterinaria Brno**, v.85, n.1, p.23-31, 2016.

LAGUNA, L.E. **Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (Cocos nucifera, L.) coco da praia e anão**, 1996. 56p. (Monografia de Especialização em Ciência Animal). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza/CE, 1996.

LÓPEZ-GAUTIUS, F.; SANCHES, G.; SANCHO, M. Effect of solid storage at 15 °C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. **Theriogenology**, v.64, n.2, p.252-260, 2005.

LÓPES-URUEÑA, E.; ANEL-LÓPEZ, L.; BORRAGAN, S.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MANRIQUE P.; PAZ, P.; ANEL, L.; ALVAREZ, M. The use of gelatine in long-term storage (up to 48h) at 5 °C preserves the pre-freezing and post-thawing quality of brown bear sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, n.5, p.700-707, 2016.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.3, p.519-526, 1996.

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEIRÊDO; RODRIGUES, L.F.S. 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, n.1, p.287-297, 2006.

MENEGAT, M.B. **Avaliação de parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo frente à homogeneização de doses de sêmen suíno armazenadas em diferentes diluentes**, 2016. 72p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

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

NAGY, S., SINKOVICS, G., KOVÁCS, A. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. **Animal Reproduction Science**, v.70, n.1/3, p.283–286, 2002.

NUNES, J.F.; SALLES, F.G.M. Água de coco (*Cocus nucifera*) na natureza, adicionada integralmente com citocina, como diluidor de sêmen caprino. **Revista Ciência Animal**, v.3, n.3, p.273–281, 1993.

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.

OLIVEIRA NETO, F.A. **Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino**, 2012. 74p. (Tese de Doutorado em Reprodução Animal). Universidade de São Paulo, 2012.

PAULENZ, H.; ADNOY, T.; FOSSEN, O.H.; SODERQUIST, L. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. **Reprodução em Animais Domésticos**, v.45, n.4, p.706-710, 2010.

TONIOLLI, R. **Pouvoir fecondant des spermatozoides de verrat: amélioration des conditions de conservation**, 1996. 91p. (Thèse de Doctorat em Cience de la Vie). Universite Francois Rabelais de Tours, France. Resumo disponível em: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsi dt=182303>, 1996.

TONIOLLI, R.; MOREIRA, F.R.C. Diferentes taxas e temperaturas de diluição do sêmen suíno: Impacto sobre a motilidade espermática. *Ciência Animal*, v.18, n.2, p.89-95, 2008.

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 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.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

YÁNIZ, J.; MARTÍ, J.I.; SILVESTRE, M.A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J.L.; LÓPEZ, G.F. Effects of solid storage of sheep sperm at 15 °C on their survival and penetration capacity. **Theriogenology**, v.64, n.8, p.1844-1851, 2005.

YONG, J.W.H.; GE, L.; FEI NG, Y.; TAN, S.N. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (Cocos nucifera L.) Water. **Molecules**, v.14, n.12, p.5144-5164, 2009