

PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DO SÊMEN SUÍNO CONSERVADO A 10 E 17 °C, EM DILUENTES COMERCIAIS E ALTERNATIVOS

(Spermatic parameters of swine semen conserved at 10 and 17 °C, in commercial and alternative extenders)

Ricardo TONIOLLI*; Jonathan Maia da Silva COSTA;
Lina Raquel Santos ARAÚJO

Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itapery, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000. E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

O uso de diluentes adequados é importante para o sucesso da inseminação artificial. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de diluentes em diferentes temperaturas. Foram utilizados os seguintes diluentes: Beltsville Thwaing Solution (BTS); TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$); TRIS + gema de ovo (TGO) e Leite em pó desnatado (LPD). Cinquenta ejaculados foram analisados quanto ao vigor, à motilidade, à funcionalidade de membrana e à atividade mitocondrial. Os diluentes TGO e LPD mantiveram os maiores valores para vigor e motilidade a 10 °C, em comparação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). A 17 °C, esses diluentes apresentaram resultados melhores de vigor e motilidade em relação aos demais, somente até D1 ($p < 0,05$). A partir de D2, o BTS mostrou-se como o melhor diluente para a preservação dessas características. Maior percentual de espermatozoides com membrana funcional foi observado no TGO a 10 °C, seguido do LPD, BTS e TRIS ($p < 0,05$). A 17 °C, o BTS manteve essa característica, exceto em D0, em que o TGO e o LPD apresentaram melhores resultados. Quanto a atividade mitocondrial, maiores valores foram observados a 10 °C no TGO em todos os dias de análise e em D0 à temperatura de 17 °C. O diluente TRIS + gema de ovo mostrou-se como uma alternativa para conservação do sêmen suíno a 10 °C, assim como o LPD. Além disso, esses mesmos diluentes constituem alternativas para conservação a curto prazo a 17 °C.

Palavras-chave: Espermatozoide, diluente, suíno, Gema de ovo, BTS, TRIS.

ABSTRACT

The use of suitable extenders is important to artificial insemination success. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficiency of extenders at different temperatures. The following extenders were used: Beltsville Thawing Solution (BTS); TRIS (Tris-hydroxymethyl-aminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$); TRIS + egg yolk (TGO), and skim powdered milk (SPM). Fifty ejaculates were analyzed regarding sperm vigor, motility, membrane functionality, and mitochondrial activity. The TGO and SPM extenders maintained the highest values for vigor and motility at 10 °C, in comparison to the other treatments ($p < 0.05$). At 17 °C, these extenders showed better results of vigor and motility compared to the others, only until D1 ($p < 0.05$). From D2, BTS proved to be the best extender to preserve these characteristics. A higher percentage of sperm with a functional membrane was observed for TGO at 10 °C, followed by SPM, BTS, and TRIS ($p < 0.05$). At 17 °C, BTS maintained this characteristic, except for D0, which showed better results for TGO and SPM. Regarding the mitochondrial activity, higher values were observed at 10 °C for TGO on all days of analysis and D0 at a temperature of 17 °C. The extender TRIS + egg yolk was shown as an alternative for the conservation of swine semen at 10 °C, as well as the SPM. In addition, these same extenders are alternatives for short-term conservation at 17 °C.

Keywords: Sperm, extender, swine, egg yolk, BTS, TRIS.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma ferramenta importante para acelerar o melhoramento genético na produção animal (PEZO *et al.*, 2019; VIANA *et al.*, 2019). Na suinocultura comumente utiliza-se o sêmen refrigerado, que fornece resultados de

fertilidade similares àqueles obtidos com a monta natural. Para conservação do sêmen suíno preconiza-se que a temperatura seja mantida entre 15 e 17 °C, pois, enquanto temperaturas mais baixas reduzem a sobrevivência espermática, temperaturas acima de 17 °C não desaceleram os processos metabólicos celulares necessários à preservação das doses de sêmen utilizadas em programas de inseminação artificial (IA) (YESTE, 2017).

No entanto, a conservação do sêmen através do processo de resfriamento induz modificações morfológicas à célula, em diferentes espécies domésticas (BAILEY *et al.*, 2000), sendo o espermatozoide suíno um dos mais sensíveis ao processo de resfriamento. Em variações da temperatura, maiores de ± 2 °C, ou em temperaturas abaixo de 15 °C, ele pode sofrer choque térmico, que pode provocar lesões irreversíveis na estrutura celular, com diminuição da permeabilidade seletiva e perda da integridade da membrana plasmática, fatos esses que levam a uma diminuição ou a perda total de sua motilidade, podendo, posteriormente, levar o espermatozoide à morte (YESTE, 2017).

Desta forma, o processamento do sêmen suíno com diluentes adequados é um dos pontos importantes para sua conservação eficiente. O diluente possui várias funções: aumentar o volume total do ejaculado, fornecer nutrientes para a produção de energia, proteger os espermatozoides contra o choque térmico, controlar o nível do pH, manter o balanço osmótico e inibir o desenvolvimento bacteriano (CORRÊA *et al.*, 2001; BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

A viabilidade do sêmen suíno mantém-se satisfatória durante 72 horas a 16 °C, em diferentes diluentes comerciais (BTS, Kiew, Androhep, Reading, MR-A; FIGUEIROA *et al.*, 2001). Entretanto, esse período é insuficiente, não permitindo um melhor aproveitamento do material genético dos reprodutores em sistema de coleta. Assim, a procura por novos diluentes, para o sêmen de diferentes espécies domésticas, levou pesquisadores a estudarem a água de coco em pó (NUNES e SALGUEIRO, 1999; TONIOLLI *et al.*, 2001; YESTE, 2017) e o leite desnatado (TONIOLLI *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012; YESTE, 2017), como alternativas viáveis na substituição dos diluentes tradicionais.

Azerêdo *et al.* (2001) relataram que visando à diluição de sêmen, pode ser utilizado o diluente TRIS-gema de ovo, devido a sua proteção aos espermatozoides. Entretanto, Salviano e Souza (2008) afirmam que devem ser adicionados antibióticos, fontes nutritivas e estabilizadoras, além de tamponantes. A adição da gema do ovo tem a função de nutrir os espermatozoides e adicionalmente ela tem propriedades termo-protetoras para a membrana plasmática, restaurando os fosfolípidios perdidos durante um possível choque térmico, que pode ocorrer durante o resfriamento do sêmen. Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina, que durante o choque térmico interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides e propicia a proteção (BOUCHARD *et al.*, 1990).

Deste modo, um diluente que permita uma melhor proteção à célula espermática e um maior período de conservação do ejaculado é importante para um maior sucesso dos resultados da inseminação artificial. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas e soluções que permitam a utilização do sêmen resfriado, sem queda dos resultados de fertilidade em particular na espécie suína (ARAÚJO *et al.*, 2016). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de diluentes alternativos para sêmen suíno, conservado em diferentes temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (LRSTS/UECE), localizada a 03° 43' 02" S e 38° 32' 35" O, com altitude média de 21 metros acima do nível do mar, índice pluviométrico anual de 1600mm e temperatura média anual em torno dos 26 °C. Os cuidados e procedimentos com os animais utilizados para coleta de sêmen foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA), sob o Protocolo nº 7157270/2015.

Animais experimentais e coleta do sêmen

Foram utilizados cinco reprodutores híbridos comerciais que pertenciam ao LRSTS da Universidade Estadual do Ceará. Os animais se encontravam em sistema rotineiro de coleta de sêmen semanal, mantidos em um sistema de confinamento, em baias individuais. A dieta fornecida apresentava os níveis proteicos, energéticos e mineral dentro dos padrões estipulados para a fase de reprodução (3.150 Kcal de energia metabolizável e 14% de PB), com um consumo diário de 2,5kg/dia, em dois arraçoamentos e água potável *ad libitum*.

O sêmen foi coletado uma vez por semana durante 9 semanas (n=45), através da técnica da mão enluvada (HANCOCK e HOVELL, 1959), em recipiente com capacidade de 500mL, coberto por gaze e protegido em copo térmico de coleta. Antes de cada coleta, foi feita uma higienização externa do baixo ventre e do prepúcio, com água corrente e sabão neutro, seguida de esgotamento prepucial no sentido caudo-cranial por pressão manual. Em seguida, as partes molhadas eram secas por meio de toalha de papel descartável. Após a coleta, o ejaculado era identificado e levado ao laboratório para o seu processamento. A presença de sangue, de odor fétido ou urinoso, indicando uma possível contaminação do ejaculado, resultava no descarte de todo material.

Avaliação do ejaculado *in natura*

No laboratório, a fração gelatinosa retida pela gaze era descartada, e a qualidade do ejaculado *in natura* era avaliada pelos seguintes critérios: temperatura (°C), volume (mL) em balança digital de precisão, concentração ($\times 10^6$ spz/mL) em espectrofotômetro, 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 avaliação das duas últimas características, uma amostra do sêmen (15 μ L) foi colocada entre lâmina e lamínula (24 x 24mm) e em seguida feita a leitura em microscopia óptica com um aumento de 200 vezes. Foram avaliados para cada característica, no mínimo, três campos de microscópio. As análises tinham por finalidade a avaliação e controle de cada ejaculado durante o período experimental. Somente os ejaculados que apresentaram valores iguais ou maiores a três (3,0), para o vigor espermático, e valores iguais ou maiores que oitenta por cento (80%), para a motilidade, foram utilizados nos protocolos experimentais (CBRA, 2013).

Diluentes, diluição e conservação

Após as primeiras avaliações, o ejaculado foi colocado em banho maria a 30 °C durante 15 minutos, e em seguida diluído de acordo com os tratamentos experimentais,

dentro da primeira meia hora pós coleta. Sêmen e diluente se encontravam sempre a mesma temperatura.

De cada ejaculado, foi retirado um total de $1,75 \times 10^9$ spz, em seguida repartido equitativamente entre os oito tratamentos (quatro diluentes e duas temperaturas; $218,75 \times 10^6$ spz/tratamento). O sêmen diluído foi mantido a uma concentração fixa de 35×10^6 spz/mL, com um volume final por tratamento de 25mL (sêmen + diluente), envasados em cinco tubos de ensaio/tratamento (5mL/tubo = 175×10^6 spz/tubo). Foram avaliados quatro diluentes: Beltsville Thawing Solution (BTS = controle); TRIS modificado; TRIS gema de ovo (TGO) = TRIS + 20% de gema de ovo; Leite em pó desnatado (LPD).

Obs.: Composição dos diluentes: **01 = TRIS modificado:** Tris-hidroximetilaminometano (3,028g - Sigma); ácido cítrico monohidratado (1,780g); D-Frutose (1,25g); estreptomicina (0,0134g); água destilada (100mL qsp) (ROBERTS, 1986); **02 = Leite em pó desnatado:** LPD (100g); glicose (1,94g); gentamicina (80mg/100mL); água destilada (100mL, qsp). Cada 100g de LPD foi composta por: carboidratos (56g); proteínas (20,8g); fibra solúvel (9,6g); sódio (300mg); cálcio (2 g); ferro (17,2mg); vitaminas A (564 µg), D (6 µg), E (18,8 mg) e C (92mg) e ácido fólico (480µg), segundo o fabricante.

O sêmen diluído a 30 °C foi submetido a duas temperaturas de conservação, 17 e 10 °C. Após a diluição e envase nos tubos de ensaio, o sêmen foi colocado em geladeira a 17 °C. Os tubos de ensaio referentes às amostras que seriam conservadas a 10 °C, permaneceram inicialmente estocados a 17 °C por 1 hora, para em seguida serem transferidos para outra geladeira a 10 °C. O sêmen foi conservado durante um total de cinco dias, sendo o dia da coleta considerado como dia zero (D0) e permanecendo por mais quatro dias (D1, D2, D3 e D4).

Análises do sêmen diluído e conservado

A cada dia de análise, os tubos equivalentes a cada ejaculado/tratamento foram retirados das geladeiras e, em seguida, levados ao banho maria a 37 °C e incubados por 10 minutos, para em seguida serem analisados conforme as características abaixo:

Vigor e motilidade espermática: visando à avaliação da qualidade espermática, foi analisado o vigor espermático (0 a 5; TONIOLLI, 1996) e a motilidade espermática (% células 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. Para essas características, o sêmen diluído e conservado foi analisado diariamente, durante todo período de conservação (D0 a D4).

Teste de Resistência Osmótica (TRO): Objetivando a avaliação da funcionalidade da membrana do espermatozoide, esse teste (hiposmótico) tem relação com a capacidade de conservação do sêmen e resultados de fertilidade. Para tal, adicionou-se 100µL de sêmen puro em 1mL de solução 100 mOs/kg de água, incubada por 40 minutos a 37 °C. Ao término dessa incubação, avaliou-se a porcentagem de espermatozoides (%) com cauda enrolada e cauda reta, através de contraste de fase com aumento de 1000 vezes, em um total de 200 células contadas. O espermatozoide com a cauda reta era indicativo de perda de funcionalidade da membrana, os que permaneceram com membrana funcional apresentavam cauda enrolada (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

Atividade mitocondrial dos espermatozoides

A atividade mitocondrial foi determinada colocando 25µL da amostra, de cada tratamento, em microtubo, seguido da adição de 25µL de 3,3 Diaminobenzidine (DAB; 1mg/mL de PBS) e incubando por 1 hora a 37 °C, protegido da luz. Após o período de incubação, retirou-se uma alíquota de 10µL, colocando entre lâmina e lamínula a 37 °C em microscópio óptico com um aumento de 100x. Classificou-se as células da seguinte forma: DAB1 (peça intermediária totalmente corada = alta atividade); DAB2 (predominância de segmentos corados ou ativos = media atividade); DAB3 (predominância de segmentos não corados ou inativos = baixa atividade); DAB4 (peça intermediária totalmente descorada = sem atividade) (CAVALCANTE *et al.*, 2005; DE AGOSTINI, 2018).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. Cada animal representou uma unidade experimental, com o número de ejaculados correspondendo ao número de repetições do experimento. A análise estatística foi feita por meio da avaliação das médias e desvios padrão, aos quais foram aplicados testes de análise de variância. As variáveis quantitativas foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. A análise das diferenças entre médias foi realizada por meio de uma variância multifatorial usando-se o *General Linear Models* (GLM) do programa *Statistical Analysis System* (SAS versão 8, 2002). Para comparação de médias, utilizou-se o teste de Tukey (variáveis paramétricas) e o teste do Qui-quadrado (resultados expressos em porcentagem), ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen *in natura* proveniente de 50 ejaculados analisados durante o experimento apresentou aspecto normal, coloração branca leitosa, volume médio de 258,0±42mL e concentração média de 405,4±26 x10⁶ spz/mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (CBRA, 2013). A análise do vigor espermático (4,5±0,5) e da motilidade espermática (93,0±5,1%) apresentaram valores do ejaculado *in natura* acima dos critérios de exclusão estipulados pela metodologia para utilização do ejaculado.

Nas amostras conservadas a 10 °C, os diluentes TRIS gema de ovo (TGO) e leite em pó desnatado (LPD) apresentaram os melhores resultados de vigor espermático ($p < 0,05$), quando comparado com os demais tratamentos (BTS e Tris), no intervalo de D0 a D4 (Tab.01). Entretanto, quando comparados entre si, o TGO foi significativamente melhor do que o LPD ($p < 0,05$), nos últimos dois dias de conservação do sêmen. O diluente TRIS, por si só, não foi capaz de proporcionar um bom vigor espermático durante todo o período de conservação, entretanto, quando adicionado da gema de ovo (TGO), ele apresentou valores médios melhores ($p < 0,05$), para essa característica, colocando em evidência a ação protetora da gema de ovo sobre a célula espermática. O diluente BTS não proporcionou uma boa proteção à célula espermática, à temperatura de 10 °C, sendo melhor apenas do que o TRIS ($p < 0,05$).

Com o sêmen diluído e conservado a 17 °C, os tratamentos TGO e LPD apresentaram

os melhores resultados de vigor espermático ($p < 0,05$) no primeiro dia de conservação (D0). O TGO manteve os melhores valores para essa característica ($p < 0,05$) até o segundo dia de conservação (D1), enquanto o tratamento LPD apresentou decréscimo significativo desse parâmetro espermático, juntamente com os diluentes Tris e TGO, a partir do dia D2 (Tab. 01).

Tabela 01: Vigor espermático (0 a 5) do sêmen suíno, conservado durante 5 dias em diferentes temperaturas (10 °C e 17 °C), nos diluentes BTS, TRIS, TGO e LPD.

Tratamentos		Dias de conservação				
		D0	D1	D2	D3	D4
10 °C	BTS	2,1±0,6 ^b	1,7±0,6 ^b	1,0±0,4 ^c	0,9±0,4 ^c	0,5±0,5 ^c
	TRIS	1,2±0,6 ^c	1,1±0,7 ^c	0,7±0,7 ^c	0,1±0,4 ^d	0,1±0,4 ^c
	TGO	3,8±0,5 ^a	3,2±0,7 ^a	2,7±0,4 ^a	2,4±0,5 ^a	2,1±0,4 ^a
	LPD	3,7±0,5 ^a	3,3±0,7 ^a	2,4±0,7 ^a	1,8±0,5 ^b	1,2±0,5 ^b
17 °C	BTS	2,7±0,8 ^b	2,5±0,8 ^b	1,6±0,6 ^a	1,5±0,6 ^a	0,8±0,8 ^a
	TRIS	1,7±0,8 ^c	1,0±1,1 ^c	0,0±0,1 ^c	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^b
	TGO	3,6±0,5 ^a	3,5±0,6 ^a	0,2±0,6 ^c	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^b
	LPD	3,6±0,5 ^a	2,9±0,7 ^b	0,5±0,7 ^b	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

LPD: Leite em pó desnatado; TRIS: Tris-hidroximetilaminometano; TGO: Tris mais gema de ovo.

Até o terceiro dia de conservação (D2), à temperatura de 17 °C, o diluente TRIS não conseguiu proporcionar uma boa proteção aos espermatozoides, que apresentaram os valores mais baixos de vigor espermático, quando comparados ao sêmen diluído nos outros diluentes, durante o mesmo período. A partir dos dois últimos dias de conservação, nos resultados dos diluentes LPD, TRIS e TGO, os espermatozoides não apresentaram células com vigor espermático (notas zero). Para essa mesma característica, entretanto, em uma temperatura de conservação mais alta (17 °C), a gema de ovo não foi capaz de proteger a célula espermática, demonstrando ser um componente importante do diluente do sêmen suíno, mas apenas para os dois primeiros dias de conservação (D0 e D1).

Na conservação do ejaculado a 17 °C, no diluente BTS, apesar de ter apresentado valores médios de vigor espermático mais baixos no início do período de conservação do sêmen (D0 e D1), a queda dos valores do vigor foi mais suave em relação aos outros diluentes testados. Estes resultados permitem sugerir uma escolha preferencial do BTS para um período de conservação maior, de até 4 dias, o que permite o transporte das doses de sêmen em pequenas e médias distâncias. Utilizando-se a temperatura de 17 °C, em conservação de duração mais curta (até 24 horas), o LPD e, particularmente, o TGO, mostraram-se como excelentes opções.

A literatura apresenta a gema de ovo e o leite desnatado como alternativas a conservação de sêmen suíno, principalmente quando estocado sob temperaturas mais baixas (5 a 10 °C). Os componentes, tanto da gema de ovo (proteínas) quanto do leite desnatado (carboidratos, proteínas e vitaminas), atuam na proteção da membrana espermática, auxiliando na redução de danos causados pela queda da temperatura (LUSIGNAN *et al.*, 2011; RUSU *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2016; TONIOLLI *et al.*, 2016a). Os resultados do presente trabalho corroboram com as afirmativas desses autores e podem ser entendidos pela melhor manutenção dos valores do vigor espermático a 10 °C, nos diluentes TGO e LPD. Já quando o armazenamento se deu a 17 °C, os diluentes TGO e LPD não mantiveram sua ação protetora

sobre a célula espermática, possivelmente devido à diminuição da capacidade de conservação do meio e/ou à contaminação microbiológica, conforme também é relatado por outros autores (KASIMANICKAM *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2016; TONIOLLI *et al.*, 2016b; TONIOLLI *et al.*, 2017). Dessa forma, frente aos resultados de vigor espermático a 17 °C, o BTS, um dos diluentes mais difundidos na suinocultura, prosseguiu como diluente de eleição (PAQUIGNON *et al.*, 1988; DIAS *et al.*, 2019).

Quanto ao percentual de espermatozoides móveis a 10 °C (Tab. 02), o TGO (83,9%) apresentou resultados semelhantes ao LPD (82,7%) apenas no primeiro dia de conservação, entre os dias (D1 a D4) o TGO apresentou maior total de espermatozoides móveis ($p < 0,05$), que os demais tratamentos. A avaliação de motilidade total a 17 °C evidenciou que o TGO (83,2%) foi semelhante ao LPD (81,6%) no primeiro dia de conservação, já no segundo dia de conservação o TGO apresentou os melhores resultados de motilidade ($p < 0,05$) em comparação com os demais tratamentos. Entretanto, a partir do terceiro dia de conservação (D2), o TGO apresentou grande decréscimo de motilidade total, juntamente com os tratamentos (LPD e TRIS), enquanto o BTS apresentou melhores taxas de espermatozoides móveis ($p < 0,05$) em comparação com os demais tratamentos.

Tabela 02: Total de espermatozoides móveis (%) do sêmen suíno, conservado durante 5 dias em diferentes temperaturas (10 e 17 °C), nos diluentes BTS, TRIS, TGO e LPD.

Tratamentos		Dias de conservação				
		D0	D1	D2	D3	D4
10 °C	BTS	64,6±7,1 ^b	51,5±6,7 ^c	21±6,8 ^c	15,2±7,8 ^c	2,6±2,5 ^c
	TRIS	46,5±5,0 ^c	32,5±6,12 ^d	13,6±9,8 ^d	8,3±9,6 ^d	3,8±7,5 ^c
	TGO	83,9±4,0 ^a	82,6±5,52 ^a	73,3±4,9 ^a	66,6±5,2 ^a	64,2±11,1 ^a
	LPD	82,7±4,9 ^a	78,2±6,4 ^b	64,2±5,1 ^b	45,38±5,6 ^b	35,6±11,9 ^b
17 °C	BTS	67,7±6,7 ^c	55,5±13,0 ^c	34,66±9,6 ^a	32,2±10,3 ^a	20,7±10,1 ^a
	TRIS	58,5±10,6 ^d	33,8±11,4 ^d	5,8±10,0 ^{bc}	3,3±9,5 ^b	0,2±0,8 ^b
	TGO	83,2±4,2 ^a	82,1±6,5 ^a	6,3±12,2 ^c	0,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^b
	LPD	81,6±6,4 ^a	76,3±9,9 ^b	10,0±11,1 ^b	0,3±0,8 ^c	0,0±0,0 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

LPD: Leite em pó desnatado; TRIS: Tris-hidroximetilaminometano; TGO: Tris mais gema de ovo.

Os resultados de motilidade espermática refletem os observados para o vigor espermático, em que os diluentes TGO e LPD conferiram uma melhor conservação da motilidade espermática a 10 °C em comparação a outros diluentes, fato também verificado por Kulaksiz *et al.* (2012). Já a 17 °C os diluentes TGO e LPD só garantiram melhor percentual de células móveis nos primeiros dias de armazenamento, provavelmente devido à natureza perecível dos diluentes.

À temperatura de 10 °C, a porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico (espermatozoides com membranas funcionais) foi significativamente maior no diluente TGO (66,05%; 57,70% e 42,80%, respectivamente) nos dias D0, D2 e D4 de conservação, quando comparada com os resultados obtidos com BTS, LPD e TRIS ($p < 0,05$) (Tab. 03). Por outro lado, na temperatura de conservação a 17 °C, os diluentes TGO (62,15%) e o LPD (61,60%) mantiveram elevada porcentagem de membranas funcionais, apenas no primeiro dia de

conservação (D0), sendo superiores aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Porém, na sequência do período de conservação do sêmen, ambos apresentaram forte queda na porcentagem de células com membranas funcionais. Por outro lado, o diluente BTS apresentou resultados melhores ($p < 0,05$) na sequência do período de conservação (D2=33,00% e D4=14,85%), quando comparado com os demais diluentes.

Tabela 03: Espermatozoides com membranas funcionais (teste hiposmótico, %), no sêmen suíno refrigerado a 10 e 17 °C, nos diluentes BTS, TRIS, TGO e LPD.

Tratamentos		D0	D2	D4
10 °C	BTS	30,9±9,6 ^c	17,15±12,8 ^c	12,9±6,6 ^c
	TRIS	21,55±13,2 ^d	12,5±12,3 ^d	9,6±12,6 ^d
	TGO	66,05±12,2 ^a	57,7±12,3 ^a	42,8±8,6 ^a
	LPD	62,35±11,6 ^b	53,5±7,8 ^b	37,35±13,2 ^b
17 °C	BTS	35,5±19,7 ^b	33,0±11,3 ^a	14,85±5,5 ^a
	TRIS	35,7±28,4 ^b	5,05±12,5 ^c	4,25±8,4 ^c
	TGO	62,15±21,7 ^a	5,6±12,5 ^c	3,7±6,4 ^c
	LPD	61,6±25,1 ^a	12,35±10,3 ^b	7,2±9,1 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

LPD: Leite em pó desnatado; TRIS: Tris-hidroximetilaminometano; TGO: Tris mais gema de ovo.

A gema de ovo adicionada ao diluente TRIS (TGO) possui moléculas como colesterol, fosfolipídios e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são importantes para proteger a membrana espermática contra o choque térmico (HU *et al.*, 2010). Em geral, atribui-se ao conteúdo de LDL a ação protetora relacionada à gema de ovo sobre as membranas das células espermáticas (SOUZA *et al.*, 2015; BASHAWAT *et al.*, 2016), o que garantiu um maior percentual de espermatozoides com membranas funcionais no diluente TGO a 10 °C durante todo o período de análise quando comparado aos demais diluentes. Da mesma forma, os constituintes do diluente LPD como a caseína (LUSIGNAN *et al.*, 2011), as lipoproteínas e as lecitinas estariam relacionadas à proteção da célula espermática contra o choque térmico, quando adicionadas ao sêmen conservado a 10 °C (FOOTE, 1974; MEMON e OTT, 1981; TONIOLLI *et al.*, 2017).

No entanto, os mesmos diluentes (TGO e LPD) submetidos a uma temperatura de armazenamento de 17 °C não foram capazes de manter a funcionalidade da membrana espermática nos demais dias de análise (D2 e D4). A temperatura de 17 °C é utilizada para a conservação das doses inseminantes, promovendo uma redução da atividade metabólica das células espermáticas, necessária à preservação (BORTOLOZZO *et al.*, 2005b), porém não é uma temperatura suficiente para conter os processos oxidativos de materiais biológicos como o leite e a gema de ovo (NESPOLO *et al.*, 2015). Dessa forma, o BTS, por ser considerado um diluente de curta duração, conservando o sêmen por até 72 horas a 17 °C (FIGUEIROA *et al.*, 2001), não apresentou oscilação quanto ao percentual de membranas funcionais entre os dias D0 e D2, sendo mais vantajoso nas avaliações dos dias D2 e D4 em relação aos demais diluentes.

No que se refere à capacidade de potencial de atividade mitocondrial, no diluente TGO, os espermatozoides apresentaram uma maior atividade mitocondrial ($p < 0,05$), nas duas temperaturas de conservação, no primeiro dia de avaliação (D0), quando comparado aos

diluentes BTS, LPD e TRIS (Tab. 04).

Tabela 04: Atividade de mitocondrial (%) de espermatozoides de suínos no D0 de conservação, nas temperaturas 10 e 17 °C e nos diluentes BTS, TRIS, TGO e LPD.

Tratamentos		DAB1	DAB2	DAB3	DAB4
10 °C	BTS	44,86±4,2 ^c	16,26±2,9 ^a	19,33±2,6 ^b	19,55±1,7 ^b
	TRIS	44,16±3,2 ^c	10,96±1,9 ^c	21,37±1,5 ^a	23,51±2,6 ^a
	TGO	69,0±2,9 ^a	12,35±1,4 ^{bc}	9,6±1,6 ^d	9,0±2,3 ^c
	LPD	64,66±2,9 ^b	13,26±1,7 ^b	13,32±2,5 ^c	8,76±1,7 ^c
17 °C	BTS	57,8±2,7 ^b	14,8±1,5 ^{ab}	18,05±1,7 ^a	9,35±2,4 ^d
	TRIS	40,9±3,0 ^c	15,7±1,6 ^a	16,25±1,9 ^{ab}	27,15±2,1 ^a
	TGO	65,5±1,8 ^a	13,2±1,7 ^c	8,35±1,9 ^d	12,95±1,9 ^c
	LPD	55,7±2,9 ^b	15,75±1,7 ^a	12,55±1,8 ^c	15,95±2,3 ^b

^{a,b,c,d}Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

LPD: Leite em pó desnatado; TRIS: Tris-hidroximetilaminometano; TGO: Tris + mais gema de ovo. DAB1 (alta atividade); DAB2 (média atividade); DAB3 (baixa atividade); DAB4 (sem atividade)

No terceiro dia de conservação (D2) o TGO manteve-se com melhor atividade mitocondrial ($p < 0,05$) que os demais diluentes na temperatura de conservação a 10 °C, no entanto quando comparado o potencial de atividade mitocondrial a 17 °C, o BTS (54%) apresentou melhor resultado ($p < 0,05$) que todos os diluentes utilizados, exceto o LPD (Tab. 05).

Tabela 05: Atividade de mitocondrial (%) de espermatozoides de suínos no D2 de conservação, nas temperaturas 10 e 17 °C e nos diluentes BTS, LPD, TRIS e TGO.

Tratamentos		DAB1	DAB2	DAB3	DAB4
10 °C	BTS	15,44±3,0 ^c	12,54±3,3 ^b	25,70±3,7 ^b	46,32±3,9 ^a
	LPD	40,20±2,6 ^b	22,10±3,4 ^a	21,20±2,8 ^c	16,50±3,3 ^c
	TRIS	14,05±1,9 ^c	13,83±2,3 ^b	37,06±2,4 ^a	35,06±2,9 ^b
	TGO	44,50±2,8 ^b	22,20±2,2 ^a	19,45±4,9 ^d	13,85±6,4 ^d
17 °C	BTS	27,00±9,3 ^a	20,00±7,4 ^a	27,50±9,7 ^b	25,50±10,2 ^d
	LPD	25,10±8,7 ^{ab}	21,10±8,3 ^a	25,40±9,6 ^{bc}	28,40±9,0 ^c
	TRIS	11,10±11,2 ^c	13,10±10,0 ^b	33,00±12,6 ^a	42,80±14,2 ^b
	TGO	22,62±10,4 ^b	9,86±8,9 ^c	19,41±12,3 ^c	48,11±10,8 ^a

^{a,b,c,d}Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

LPD: Leite em pó desnatado; TRIS: Tris-hidroximetilaminometano; TGO: Tris mais gema de ovo. DAB1 (alta atividade); DAB2 (média atividade); DAB3 (baixa atividade); DAB4 (sem atividade)

No último dia de avaliação embora o TGO tenha apresentado semelhança quanto ao potencial de atividade mitocondrial do BTS em grau (DAB 1), quando observado o grau (DAB 3), na temperatura de conservação de 10 °C, o TGO apresenta melhor potencial de atividade mitocondrial ($p < 0,05$), em relação aos demais diluentes (Tab. 06). Quando se comparou a atividade mitocondrial no dia 5 do experimento (D4, de conservação) a 17 °C, observou-se melhores resultados de potencial mitocondrial nos diluentes BTS e LPD ($p < 0,05$), em relação aos tratamentos TGO e TRIS (Tab. 06).

Tabela 06: Atividade de mitocondrial (%) de espermatozoides de suínos no D4 de conservação, nas temperaturas 10 e 17 °C e nos diluentes BTS, LPD, TRIS e TGO.

Tratamentos		DAB1	DAB2	DAB3	DAB4
10 °C	BTS	17,50±10,2 ^a	12,78±3,5 ^c	60,41±8,4 ^c	8,41±10,8 ^a
	LPD	2,85±1,5 ^c	14,75±6,1 ^a	55,75±1,8 ^a	26,65±7,1 ^c
	TRIS	7,00±8,1 ^b	8,00±6,4 ^{bc}	44,00±7,2 ^b	41,00±10,2 ^b
	TGO	11,0±10,2 ^a	8,50±7,9 ^b	54,25±13,4 ^{ab}	26,25±10,5 ^c
17 °C	BTS	5,87±4,7 ^b	11,13±6,9 ^a	38,37±13,2 ^c	44,63±8,1 ^b
	LPD	8,25±6,5 ^a	10,53±8,5 ^a	30,60±12,8 ^d	50,62±8,1 ^a
	TRIS	1,13±1,1 ^c	0,87±1,1 ^c	45,00±8,4 ^b	53,00±7,0 ^a
	TGO	2,50±2,2 ^c	5,60±1,5 ^b	50,00±12,9 ^a	41,85±10,7 ^c

^{a,b,c,d} Letras diferentes sobscritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$). LPD: Leite em pó desnatado; TRIS: Tris-hidroximetilaminometano; TGO: Tris mais gema de ovo. DAB1 (alta atividade); DAB2 (média atividade); DAB3 (baixa atividade); DAB4 (sem atividade)

A atividade mitocondrial é um parâmetro que mantém relação com a motilidade dos espermatozoides (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998), pois uma estrutura estável na membrana plasmática nos espermatozoides, especialmente na cauda, manterá o trabalho da enzima aspartato aminotransferase na extração de energia do ATP para ADP e ADP para AMP (RIZAL, 2003), importantes para manutenção da atividade mitocondrial e propulsão dos espermatozoides (motilidade). Dessa forma o diluente TGO foi o que melhor preservou a atividade mitocondrial no sêmen suíno, no D0 em ambas as temperaturas e em D2 sob 10 °C, em relação aos demais tratamentos, dada pelo maior percentual de células classificadas como DAB1 (Fig. 01). Isso pode ser atribuído aos componentes da gema de ovo que podem servir como fonte de energia, além de proteger os espermatozoides do choque pelo frio (KULAKSIZ *et al.*, 2010).

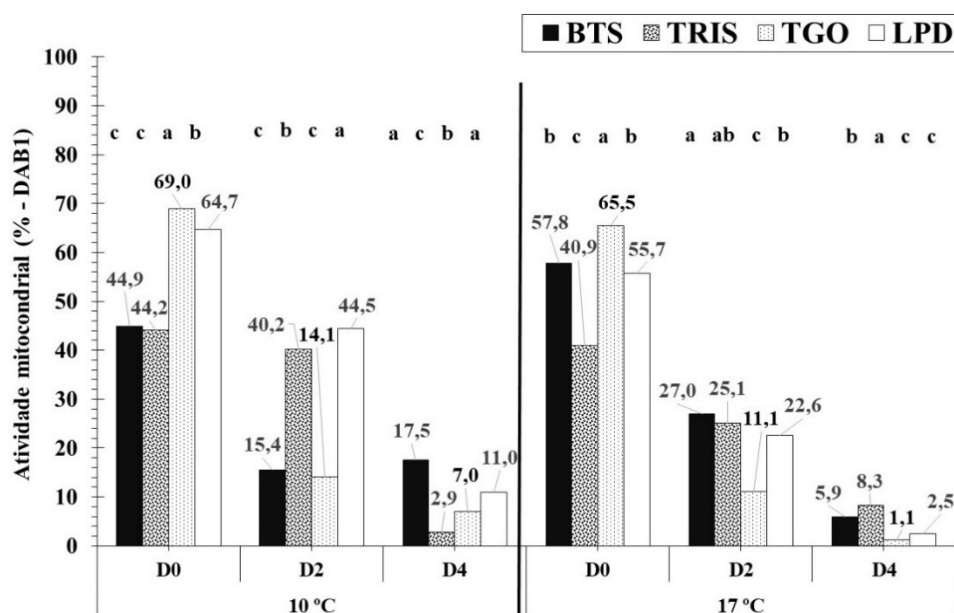


Figura 01: Porcentagem (%) de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB1), durante o período de conservação do sêmen suíno, a 10 e 17 °C, nos diluentes BTS, LPD, TRIS

e TGO.

A proteção à membrana espermática é essencial para manutenção de sua funcionalidade. De acordo com Rizal (2003), danos à membrana pode gerar perdas de enzimas necessárias ao processo metabólico, com prejuízos à produção de energia e conseqüentemente à motilidade espermática. A partir de D2, observou-se uma queda brusca na atividade mitocondrial das células espermáticas, comum a todos os tratamentos, o que estaria relacionado ao envelhecimento celular e aos danos à membrana espermática causado pelas espécies reativas ao oxigênio produzidas durante a conservação do sêmen, mesmo a baixas temperaturas (JOFRÉ *et al.*, 2019), sendo superior naquelas amostras constituídas por leite ou gema de ovo.

CONCLUSÕES

O diluente TRIS adicionado de gema de ovo mostrou-se, segundo avaliações *in vitro*, como uma alternativa para conservação do sêmen suíno a 10 °C, bem como o LPD. Esses mesmos diluentes constituem alternativas para conservação a curto prazo (24 horas) quando conservado a temperatura convencional, 17 °C, enquanto o BTS, nessa temperatura, é uma boa escolha para conservações mais longas, permitindo o transporte das doses de sêmen para outras localidades em até médias distâncias. No entanto, maiores estudos são necessários a fim de avaliar esses diluentes em testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.A.; DACHEUX, J.L.; GUÉRIN, Y. Insémination Artificielle Ovine - Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle. 1^a ed., Saarbrücken: Presses Académiques Francophones, 2012. 173p.
- ARAÚJO, L.R.S.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; TONIOLLI, R. Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.1, p.26-35, 2016.
- AZERÊDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen tawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, v.41, p.257-263, 2001.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*, v.21, p.1-6, 2000.
- BASHAWAT, M.; MOUSSA, M.; ALMERESTANI, M.R.; DESTRUMELLE, S.; TAINURIER, D. The Use of Different Low-Density Lipoproteins Concentrations for Developing a New Extender for Awassi Ram's Semen. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, v.17, n.1, p.21-30, 2016.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.1732, 2005.

- BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, v.34, p.147-157, 1990.
- CAVALCANTE, T.V.; ESPER, C.R.; FERREIRA, J.L.; DIAS, F.E.F.; AZEVEDO, H.C.; CORDEIRO, M.F.; SOUZA, J.A.T. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelamento de caprinos das raças boer e alpina no outono e primavera. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.2, p.89-93, 2005.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA JUNIOR T, DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. 1ª ed., Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001. 181p.
- DE AGOSTINI, L.J.D.; ANGRIMANI, D.S.R.; LEITE, R.F.; SIMOES, B.C.S.; BARNABE, V.H.; NICHI, M. Spermatic mitochondria: role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment. *Zygote*, v.26, n.4, p.251-260, 2018.
- DIAS, A.V.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S.; CANTANHÊDE, 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.
- FIGUEIROA, P.T.B.; SALVIANO NETO, P.; OLIVEIRA, R.R. Avaliação da viabilidade do sêmen suíno submetido à refrigeração. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, p.442-445, 2001.
- FOOTE, R.H. Artificial Insemination. In: HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 1ª ed., Philadelphia: Ed. Lea and Lebigger, p.409-431, 1974.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. *Veterinary Record*, v.71, p.664-665, 1959.
- HU, J.H.; LI, Q.W.; ZAN, L.S.; JIANG, Z.L.; AN, J.H.; WANG, L.Q.; JIA, Y.H. The cryoprotective effect of lowdensity lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, v.117, n.1/2; p.11-17, 2010.
- JOFRÉ, I.; CUEVAS, M.; CASTRO, L.S.; LOSANO, J.D.A.; TORRES, M.A.; ALVEAR, M.; SCHEUERMANN, E.; ANDRADE, A.F.C.; NICHI, M.; ASSUMPCÃO, M.E.O.; ROMERO, F. Antioxidant effect of a polyphenol-rich Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) extract and its effect on the regulation of metabolism in refrigerated boar sperm. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2019, Article ID2917513, p.1-15, 2019.
- KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. *Small Ruminant Research*, v.99, p.208- 213, 2011.
- KULAKSIZ, R.; ÇEBİ, Ç.; AKÇAY, E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turk. Journal of Veterinary and Animal Science*, v.36, n.2, p.177-182, 2012.

- KULAKSIZ, R.; CEBI, C.; AKCAY, E.; DASKIN, A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*, v.88, n.1, p.12–15, 2010.
- LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biology of Reproduction*, v.85, p.457-464, 2011.
- 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.
- 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.
- NESPOLO, C.R.; OLIVEIRA, F.A.; PINTO, F.S.T.; OLIVERA, F.C. *Práticas em tecnologia de alimentos*. 1ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2015. 220p.
- 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.
- PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, J.; BARITEAU, F. Efficacité des techniques de conservation de la semence de verrat. *INRA - Production Animal*, v.1, p.271-280, 1988.
- PEZO, F.; ROMERO, F.; ZAMBRANO, F.; SÁNCHEZ, R.S. Preservation of boar semen: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, v.54, n.3, p.423–434, 2019.
- RIZAL, M. Pengaruh penambahan glutation je dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen cair domba garut. *Buletin Peternakan*, v.27, n.2, p.63–72, 2003.
- RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEN, A.C.; PEREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LOPEZ-PEREZ, M.J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*, v.44, n.8, p.1616-1620, 1998.
- RUSU, A.V.; MICLEA, V.; ZAHAN, M. Egg Yolk Protective Effect in Boar Spermatozoa Cooled at 5 °C. *Animal Science and Biotechnologies*, v.44, n.1, p.447-452, 2011.
- SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.3, p.159-167, 2008.
- SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; CASTELO, T.S.; OLIVEIRA, M.G.C.; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Sperm characteristics following freezing in extenders supplemented with whole egg yolk and different concentrations of lowdensity lipoproteins in the collared peccary (*Pecari tajacu*). *Reproductive Biology*, v.15, n.4; p.223-228, 2015.
- TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoides du) verrat: amèlioration des conditions de conservation. 1996. 91p. (Rabelais de Tours, France). These (Doctorat) Université François Rabelais https://revistas.ufg.emnuvens.com.br/vet/rt/printerFriendly/18885/20179_8/8 de Tours. Resumo disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=182303>> Acesso em: 8 nov 2016.
- TONIOLLI, R.; JATHAY, 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, Belo Horizonte, v.62, n.5, p.1072-1079, 2010.

TONIOLLI, R.; MOREIRA, F.R.C.; TONIOLLI, L.S.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S. Motilidade espermática no sêmen suíno adicionado de gema de ovo de quatro linhagens de galinhas. Ciência Animal, v.26, n.3, p.52-65, 2016a.

TONIOLLI, R.; BARROS, T.B.; TONIOLLI, L.S.; GUIMARÃES, D.B.; FREITAS, E.N.; NUNES, T.G.P. Diferentes concentrações de gema de ovo em pó adicionada ao diluente acp-103[®] na conservação do sêmen suíno. Ciência Animal Brasileira, v.17, v.2, p.243-251, 2016b.

TONIOLLI, R.; TONIOLLI, L.S.; ARAÚJO, L.R.S.; DIAS, A.V.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F. Adição de trolox ao diluente leite em pó desnatado, durante a conservação do sêmen suíno a 10 °C. Ciência Animal, v.27, n.1, p.03-19, 2017.

VIANA, C.H.C.; MARQUES, M.G.; JORGE NETO, P.N. Sêmen suíno no Brasil: biotecnologias e mercado. IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2019, Goiânia, p.1-7. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1124972/1/original9162.pdf>>. Acesso em: 8 nov 2016.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. Animal Reproduction, v.14, n.1, p.69-81, 2017.