

## **QUALIDADE MORFOFUNCIONAL DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO CONSERVADO NOS DILUENTES ACP®- 103 e BTS**

(Morfo-functional quality of swine spermatozoa in conservation into BTS and coconut water powdered extender)

**Ricardo TONIOLLI<sup>1\*</sup>; Gilson Hélio TONIOLLO<sup>2</sup>; Paulo Henrique FRANCESCHINI<sup>2</sup>; Fernanda Maria de Almeida Celestino MORATO<sup>2</sup>**

1- Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. Av. Paranjana, 1700 - Campus do Itaperi. CEP: 60.740-000, e-mail: toniulli@roadnet.com.br

2- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal

### **RESUMO**

Com a finalidade de se testar a ação do diluente água de coco em pó sobre as características morfológicas do espermatozoide suíno, o sêmen de sete reprodutores foi coletado, sendo separado de cada ejaculado um total de  $1,75 \times 10^9$  spz entre os dois tratamentos, com concentração de  $35 \times 10^6$  spz/mL. Usou-se o BTS como controle, sendo testado o diluente água de coco em pó. O dia de coleta foi D0, sendo o sêmen conservado durante 5 dias, com análises em: D0 e D4. A avaliação da qualidade espermática baseou-se nos resultados da produção espermática, morfologia espermática, resistência osmótica e número de células vivas. Para o delineamento experimental, utilizou-se o teste de Mann Whitney (SAS 6.03), a um intervalo de confiança de  $p < 0,05$ . O resultado da resistência osmótica foi excelente, com 71,3% de espermatozoides com cauda enrolada. Não houve diferença estatística entre os dois diluentes testados para a característica células com acrossoma intacto (BTS = 67,1%; ACP = 71,2%). O sêmen diluído em ACP® - 103 apresentou um maior número de células vivas (77,7 %) após conservação, estatisticamente diferente em relação ao BTS (58,4 %). A escolha do diluente ACP®-103 é aconselhável para o uso de rotina em laboratórios que trabalhem com conservação de sêmen suíno.

PALAVRAS-CHAVE: Água de coco em pó, sêmen, morfologia, teste hiposmótico, varrão.

### **ABSTRACT**

In order to test the action of coconut water powdered extender on the morphological characteristics of swine spermatozoa, the semen of seven swine males was collected and it was separate from each un a total of  $1.75 \times 10^9$  spz, among the treatments, to a concentration of  $35 \times 10^6$  spz/mL. The BTS was used as control, being tested the coconut water powdered extender. The day of collection was considered D0, with a semen conservation for 5 days, with analyses in D0 and D4. The evaluation of spermatic quality was based in the results of the spermatic production, spermatic morphology, osmotic resistance and the alive cels number. The experimental statistic test used was the Mann Whitney (SAS 6.03), with a trust interval of  $p < 0.05$ . The medium results of the osmotic resistance were excellents, with 71.3% of spermatozoa with coiled tail. There were not statistics differences among the two extenders tested for the characteristic cells with intact acrossome (BTS = 67.1%; ACP = 71.2%). The semen diluted in ACP®-103 extender presented a higher number of alive cells (77.7%) after conservation period, statistically different from the BTS (58.4%). The choice of ACP®-103 extender is advisable for the routine use in laboratories that work with conservation of swine semen.

KEYWORDS: cocconut water powdered, semen, morphology, hyposmotic test, boar.

## INTRODUÇÃO

Vários são os testes laboratoriais utilizados para a avaliação do ejaculado suíno (Slaweta et al., 1981). Entretanto, apesar de sua grande variedade, ainda não se tem uma definição precisa para um sêmen fértil (Yavez et al., 1995). Tem-se obtido bons resultados morfológicos com a utilização do Beltsville Thawing Solution (BTS) (Perez Marcos et al., 1991), em relação a outros diluentes comerciais. Uma vez que a função acrossômica desempenha importante papel nos processos de fertilização, sua avaliação torna-se indispensável para a avaliação de um ejaculado (Toniolli et al., 1999). O importante papel da morfologia nos processos reprodutivos foi evidenciado desde as décadas de 20 e 30, quando verificou-se que valores acima de 18% de células anormais no ejaculado, apresentam efeito negativo sobre a taxa de fertilização (Lagerlof, 1934).

Por outro lado, a longevidade espermática do sêmen do varrão, tem-se mantido satisfatória durante um período de 72 horas a uma temperatura de 16 °C em diferentes diluentes atualmente utilizados, tais como Androhep e Androstars (Fugueiôa et al., 2001), período esse insuficiente para um melhor aproveitamento de reprodutores de um determinado plantel. A qualidade acrossomal é de suma importância dentro do estudo morfológico espermático (Berger et al., 1996) e, em particular na espécie suína, uma vez que o espermatozoide é extremamente sensível à redução de temperatura.

A procura por novos diluentes para o sêmen do varrão levou pesquisadores a desenvolverem a água de coco em pó (ACP®-103) que tem-se tornado uma alternativa viável na substituição dos produtos comerciais existentes no mercado (Silva et al., 2007) e que se caracteriza pela padronização e estabilização da água de coco in natura na forma de pó (Salgueiro et al., 2007). O

presente trabalho teve como objetivo testar a água de coco em pó na conservação prolongada do sêmen do varrão sob a forma refrigerada, através da análise das características morfológicas do ejaculado, além da motilidade espermática e resistência osmótica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O sêmen de sete reprodutores foi coletado durante doze semanas ( $n = 84$ ), através da técnica da mão enluvada em recipiente coberto por gaze e protegido por copo térmico, sendo utilizado o ejaculado total após a separação da parte gelatinosa. A qualidade do ejaculado (sêmen in natura) foi avaliada pela concentração ( $\times 10^6$  spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz), vigor espermático (0 a 5 – Toniolli, 1996) e porcentagem de células móveis (%).

Foi separado de cada ejaculado um total de  $1,75 \times 10^9$  spz, divididos em dois tratamentos a concentração de  $35 \times 10^6$  spz/mL e volume final total de 25 mL por tratamento (sêmen + diluente), em 5 tubos de ensaio/tratamento (5 mL =  $175 \times 10^6$  spz/tubo). Cada tubo era referente a um dia de análise, sendo conservados entre 15 e 17 °C. O dia de coleta foi considerado dia zero (D0), sendo o sêmen conservado até 4 dias após (D4), com análises em: D0, após coleta e diluição (Exame 1) e D4, antes da incubação (Exame 2). O Beltsville Thawing Solution (BTS) foi o tratamento controle, sendo testado o diluente água de coco em pó (ACP®-103), oriundo da desidratação da água de coco in natura, pela técnica do “spray dry” (Salgueiro et al., 2002), sendo reconstituída nas seguintes proporções: 24g de ACP®-103 + 100mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80 mg/100 mL. A cada dia de análise, tubos de cada ejaculado/tratamento, foram incubados a 37 °C por 10 minutos.

Visando a execução do teste de termorresistência, uma segunda leitura do vigor foi feita aos 120 minutos de incubação do sêmen. Este teste foi aplicado durante todo o período de conservação do sêmen (D0, D1, D2, D3 e D4) e consistiu na incubação do sêmen, à temperatura de 37 °C durante 2 horas. Aos resultados do vigor espermático, nos dois momentos anteriormente citados, aplicou-se uma fórmula matemática, para se calcular a taxa de degradação média da motilidade:

$$\text{TDM (\%)} = [(\text{vigor 10 minutos} - \text{vigor 2 horas}) / (\text{vigor 10 minutos})] \times 100$$

Para o teste de resistência osmótica (TRO), adicionou-se 100 µl de sêmen em 1 mL de solução 100 mOs/Kg de água destilada, incubada por 40 minutos a 37 °C. Avaliou-se a proporção de espermatozoides com cauda enrolada e reta em microscopia óptica, utilizando-se do contraste de fase com aumento de 1000 vezes, em um total de 200 espermatozoides contados. A cauda reta é indicativa de ruptura de membrana e a enrolada de integridade de membrana. Considera-se um sêmen de boa qualidade aquele que tiver, no mínimo, 50% de espermatozoides que reagiram ao teste e enrolaram a cauda.

As amostras para morfologia e vitalidade foram processadas em D0, após coleta e diluição (Exame 1) e D4, antes da incubação (Exame 2), considerando-se as seguintes características: a) morfologia do acrossoma (intacto ou danificado) e vitalidade (% de células vivas), onde os espermatozoides foram classificados em 3 categorias: 1. Vivos com acrossoma intacto; 2. Vivos com acrossoma danificado; 3. Mortos; b) Análise geral do espermatozoide (cabeça, PI, flagelo, GCP, GCD e teratologia). Foram feitos esfregaços de sêmen corados, contando-se 200 células/esfregaço em microscopia óptica com lente de imersão (aumento de 1000x). A solução corante foi formada por: azul de bromofenol = 0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada =

10 mL, que permite a determinação simultânea do estado acrossomal e da vitalidade espermática. Juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante, sendo homogeneizada em seguida. Após 30 segundos, procedeu-se ao esfregaço, sendo secado à temperatura ambiente.

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso, com a análise estatística feita pela avaliação das médias e desvios padrões, com aplicação de testes de análise de variância. Os testes propostos foram o de Mann Whitney, para a comparação entre grupos e o Qui-quadrado corrigido, para os resultados expressos em porcentagem. 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, 1988), com um intervalo de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores espermáticos médios obtidos após as coletas de sêmen encontraram-se dentro dos parâmetros fisiológicos aceitos pelo CBRA (1998), apresentando os seguintes resultados: concentração espermática =  $338 \times 10^6$  spz/mL; volume = 274 mL. Na característica total de espermatozoides, o valor  $88,5 \times 10^9$  spz situou-se acima dos padrões médios fisiológicos, sugerindo saúde, nível nutricional e manejo reprodutivo adequados.

Nas avaliações do sêmen in natura, o vigor espermático e a porcentagem de células móveis foram muito bons (4,1 e 91 %, respectivamente), ficando acima dos parâmetros mínimos exigidos (3,0 e 70%) pelo CBRA (1998) para sua utilização. Dessa forma, entendeu-se não ter havido influência dos ejaculados utilizados sobre as variáveis in vitro analisadas no sêmen diluído, sendo os resultados encontrados devido à ação dos diferentes tratamentos.

Figura 01: Valores da taxa de degradação média da motilidade (TDM, %) do espermatozoide suíno, diluído nos diluentes BTS e ACP®-103, conservados entre 15 e 17° C durante 5 dias e analisados após 10 e 120 minutos de incubação a 37° C

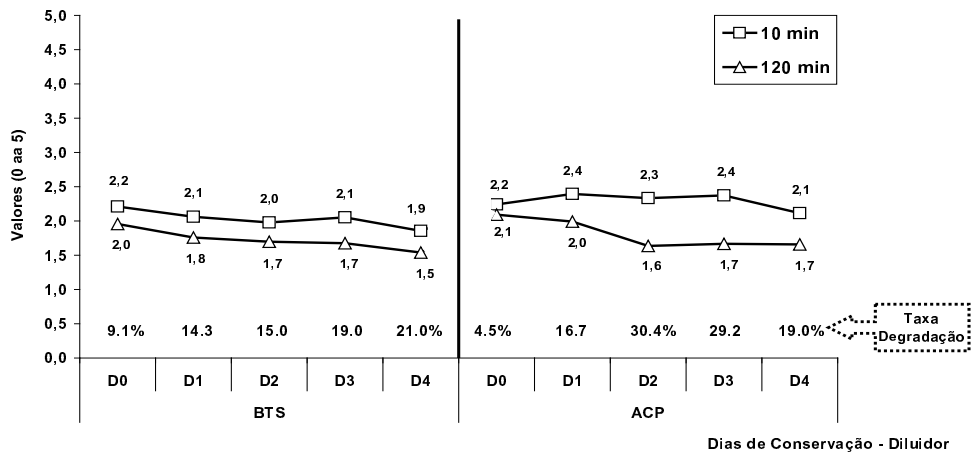
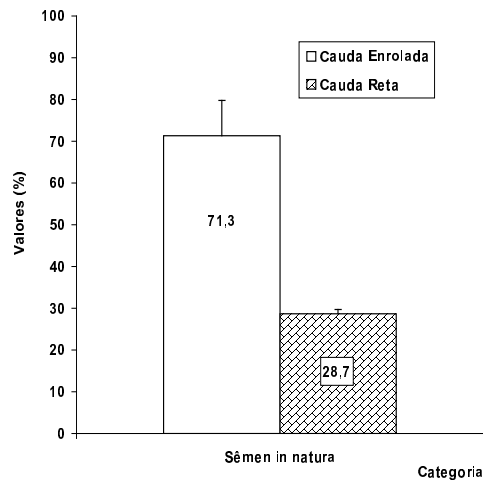


Figura 2: Porcentagem média total de espermatozoides com cauda enrolada e reta, no sêmen suíno in natura (sêmen puro), após avaliação pelo teste de resistência osmótica.



Durante o período de conservação do sêmen, a queda dos valores do vigor espermático entre o primeiro (D0) e último (D4) dias de análise aos 10 minutos de incubação foi significativamente menor no sêmen conservado no ACP®-103 (4,5 % = 2,2 a 2,1), em comparação ao BTS (13,6 % = 2,2 a 1,9); da mesma forma que aos 120 de incubação com 19,0 % (2,1 a 1,7) e 25,0 % (2,0 a 1,5), respectivamente. Verificou-se, dessa forma, que as condições de conservação do sêmen foram melhores quando diluído no ACP®-103, em relação ao BTS (Fig. 1). A grande maioria dos trabalhos relacionados com a conservação do sêmen refrigerado reporta sua importância como técnica associada ao seu uso em programas de inseminação artificial (Rodríguez-Gil, 2006), uma vez que os mecanismos fisiológicos do espermatozoide suíno estão adaptados a um curto tempo de sobrevivência pós ejaculação (Hunter, 1982), sendo importante, assim, o conhecimento das reais condições de conservação desse sêmen.

Analisando-se a TDM em cada dia de conservação do sêmen, constatou-se que apesar de, no geral, terem sido as maiores porcentagens de queda verificadas no sêmen diluído no ACP®-103, os valores podem ser considerados relativos, uma vez que o vigor espermático aos 10 minutos de incubação nesse diluente foi significativamente melhor ( $p < 0,05$ ) do que o encontrado no BTS. Apenas ao início (D0) e final (D4) da conservação, as diferenças não foram significativas ( $p > 0,05$ ). Outro resultado que chamou a atenção, foram os valores do vigor espermático aos 120 minutos de incubação, que no diluente ACP®-103, foram mais altos do que os encontrados no sêmen diluído no BTS, apesar de uma degradação maior em D1 (16,7% x 14,3%), D2 (30,4% x 15,0%) e D3 (29,2% x 19,0%), respectivamente (Fig. 1). A conservação do espermatozoide suíno está associada à especialização de suas características, que influenciam na decisão

da estratégia de refrigeração. Desta forma, o tipo de diluente utilizado precisa permitir uma manutenção das funções espermáticas durante um determinado tempo de conservação (Rodríguez-Gil, 2006). O diluente ACP®-103 apresentou características positivas a essa finalidade, mesmo tendo apresentado uma queda dos valores de motilidade durante o período de conservação do sêmen, da mesma forma como verificado por outros autores (Figueirôa et al., 2001). Apesar de ser um bom indício, não se pode esquecer que a influência das características *in vitro* sobre a possibilidade de fecundação do sêmen ainda apresenta dificuldades de precisão, devido a grandes variáveis de correlação (Rodríguez-Martinez, 2006).

O teste de resistência osmótica visa avaliar a condição estrutural e funcional da membrana plasmática do espermatozoide (Snoeck et al., 2007). Uma membrana espermática funcional reage ao meio hipotônico e, como resposta à diminuição de sua osmolaridade interna, a célula enrola seu flagelo (Melo & Henry, 1999). Já as células com membrana lesada, perdem essa funcionalidade e apresentam espermatozoides com a cauda reta. Aceita-se como ejaculado normal, aquele que apresente pelo menos 50 % de células com caudas enroladas. Baseado nesse valor, o resultado de 71,3 % de espermatozoides com cauda enrolada foi excelente (Fig. 2), superando valores encontrados na literatura (Juliano et al., 2002; Tonieto et al., 2002).

Quando se analisou a porcentagem de caudas enroladas por reprodutor, verificou-se que todos os machos apresentaram resultados acima dos 50 %, possibilitando, assim, a manutenção de seu metabolismo e capacidade fecundante (Neild et al., 1999). Apesar de ter havido algumas diferenças significativas entre reprodutores, com variação entre 62,6 e 75,2%, os resultados demonstraram que foi usado sêmen de ótima qualidade e que nenhum deles, por esta característica, influenciou nos resultados dos

testes feitos pelo protocolo experimental (Fig. 3).

Analisando-se a morfologia espermática no dia da coleta do sêmen (D0), houve uma queda na porcentagem de células com acrossoma intacto no sêmen diluído (BTS = 67,1%; ACP®-103 = 71,2%), em relação ao sêmen in natura (79,6%), sendo as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparados o BTS e o ACP®-103. Esses resultados diferem dos obtidos por Toniolli et al. (1999), onde o diluente BTS obteve um menor número de células com acrossoma intacto. Nesse caso, foi utilizado o ácido 3-indol acético, princípio ativo derivado da água de coco em concentrações maiores do que as encontradas no ACP®-103. Dentro da característica acrossoma danificado, as diferenças entre os tratamentos (sêmen puro = 8,1%; diluído em BTS = 16,2% e ACP®-103 = 12,5%) foram todas significativas ( $p < 0,05$ ), tendo o sêmen diluído no BTS o maior número de células danificadas. Na última característica, células mortas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (puro = 13,0%; BTS = 16,7% e ACP®-103 = 16,3%) ( $p > 0,05$ ) (Fig. 4). O abaixamento da temperatura pode proporcionar um aumento do número de células com acrossoma danificado (Petrunkina et al. (2005), fato esse que foi minimizado com o uso do ACP®-103.

Após o período de conservação do sêmen (D4), comparando-se os resultados de integridade acrossômica, verificou-se que o diluente ACP®-103 proporcionou um melhor meio aos espermatozoides, traduzido por um maior número de células vivas com acrossoma íntegro (65,0%), em relação ao BTS (40,1%) ( $p < 0,05$ ). A ação das temperaturas mais baixas sobre a característica estudada pode ser vista nesse trabalho, da mesma forma que citada por diferentes autores (Ruvalcaba & Conde Martinez, 2005; Lima et al., 2007), evidenciando a ação protetora do ACP®-103 sobre a célula espermática. Considerando-se

que o BTS é um meio diluidor com uso limitado a alguns dias, o uso do ACP®-103 abriu novas perspectivas para uma melhor conservação do sêmen do varrão. O diluente água de coco em pó apresentou-se como um excelente meio de conservação para a célula espermática suína, que associado a novas técnicas de inseminação artificial, como a intrauterina e à importância da função acrossômica no processo de fecundação (Bortolozzo et al., 2005), poderá proporcionar melhores resultados de fertilidade. Em relação à porcentagem de espermatozoides vivos, os melhores resultados foram encontrados também com o sêmen diluído no ACP®-103 (22,3%), em relação ao BTS (41,5%) ( $p < 0,05$ ). Na característica acrossoma danificado, não houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Fig. 4).

Através de uma determinação simultânea do estado acrossomal e vitalidade espermática (Stornelli et al., 2001), verificou-se que no dia da coleta de sêmen (D0) não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os resultados dos diferentes tratamentos (sêmen puro = 87,7%; diluído em BTS = 83,3% e em ACP®-103 = 83,7%). Entretanto, após o período de conservação (D4), o sêmen diluído em ACP®-103 apresentou um maior número de células vivas (77,7 %), em relação ao BTS (58,4 %) ( $p < 0,05$ ). Dependendo da espécie animal e do diluente utilizado, pode-se diminuir a influência do período de incubação sobre a viabilidade da célula espermática (Braz et al., 2003) e no caso do sêmen suíno, o diluente ACP demonstrou ser um meio de diluição/conservação adequado ao espermatozóide suíno, mantendo um maior número de espermatozoides viáveis (Fig. 5).

Analisando-se as características morfológicas totais da célula espermática suína em D0, houve uma equivalência dos resultados de células normais entre o sêmen diluído no ACP (83,0%) com o sêmen in natura (86,9%) ( $p > 0,05$ ), sendo superiores aos resultados obtidos

com o BTS (79,8%) ( $p < 0,05$ ). Nas demais características analisadas, a exceção do flagelo, e apesar de algumas diferenças encontradas, todos os valores ficaram abaixo do nível máximo de 5%. Para a característica flagelo (puro = 8,5%; BTS = 9,6%; ACP®-103 = 6,9%), as diferenças encontradas entre os tratamentos não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 6). Após o período de conservação do sêmen (D4), mais uma vez o sêmen diluído no ACP (83,8%) apresentou um maior número de células normais em comparação ao BTS (71,7%) ( $p < 0,05$ ). Os resultados deste trabalho obtidos com o uso do ACP®-103 estão de acordo com os outros autores (Uchoa et al., 2003; Barbosa et al., 2007) com o sêmen canino, sendo o ACP um diluente que pode ser utilizado para a conservação do sêmen de diferentes espécies animais. Para as demais características, os valores ficaram abaixo de 5%, à exceção dos problemas no flagelo, que aumentaram para 12,6% (BTS) e 8,6% (ACP®-103) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6). Esta propriedade do ACP®-103 em manter um maior número de células viáveis também pode ser vista quando da conservação do sêmen ou células de outras espécies animais tais como caprinos (Costa et al., 2002), ovinos (Salgueiro et al., 2007) e primatas não humanos (Araújo et al., 2007).

## CONCLUSÕES

Na sua quase totalidade os resultados indicaram que o diluente água de coco em pó mostrou-se mais adaptado a fornecer as condições necessárias para a conservação do sêmen suíno em temperaturas entre 15 e 17 °C. A escolha do ACP é aconselhável para o uso de rotina em laboratórios que trabalhem com manipulação e conservação de ejaculados de reprodutores suínos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, L.L., OLIVEIRO, K.G., LIMA, J.S., PANTOJA, P.S.P.; ARAÚJO, J.B.; DOMINGUES, S.F.S. Preservação de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37 °C. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1, 2007, Curitiba. Anais ... Curitiba: 2007. p.192. (Resumo).
- BARBOSA, C.C., LOPES-NETO, B.E., MADEIRA, V.L.H., LIMA, A.H.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Criopreservação de sêmen canino com diluidor à base de água de coco em pó (ACP 106): Efeito da concentração de gema de ovo. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 1, 2007, Curitiba. Anais ... Curitiba: 2007. p.177. (Resumo).
- BRAZ, V.B., ARAÚJO, A.A., NUNES, J.F., MACHADO, V.P.; MOURA, A.A.A.; OLIVEIRA, K.P.L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.328-329, 2003.
- BERGER, T., ANDERSON, D.L., PENEDO, M.C.T. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science*, v.44, p.231-239, 1996.
- BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I., DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientifica Veterinariae*, v.33, n.1, p.17-32, 2005.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA) Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: Belo Horizonte, 2ª Edição, 1998. 49p.
- COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R., FERREIRA, M.A.L., MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.F. Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, n.6, p.324-330, 2002.
- FIGUEIRÔA, P.T.B., SALVIANO NETO, P.,

- OLIVEIRA, R.R., SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P.; MORENO, F.A.B.; WISCHRAL, A. Avaliação da viabilidade do sêmen suíno submetido a refrigeração. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.3, p.442-443, 2001.
- JULIANO, F., COLLARES, T., TONIETO, S.R., TONIETO, R.A.; SCHMITT, E.; BORDIGNON, J.; CORRÊA, M.N.; LUCIA Jr, T.; BIANCHI, I.; DESCHAMPS, J.C. Choque hipoosmótico em espermatozóides suínos relacionado com os testes convencionais de avaliação da qualidade espermática. In: Congresso Latino Americano de Suinocultura, 1, 2002, Foz do Iguaçu. Anais ... Foz do Iguaçu: 2002. p.195-196.
- HUNTER, R.H.F. Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract and the eggs investments. In: Control of Pig Reproduction, 1, 1982, London. Anais ... London: 1982. p.49-64.
- LAGERLÖF, N. Morphological studies on the changes in the sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, Supp.19, p.254, 1934.
- LIMA, F.P., MURGAS, L.D.S., MILLER, J., ALVARENGA, A.L.N.; ZANGERONIMO, M.G.; SILVA, A.C.; ARAÚJO, R.S. Efeito da concentração espermática e do tempo de incubação na motilidade, vigor e morfologia de espermatozóides suínos. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1, 2007, Curitiba. Anais ... Curitiba: 2007. p.228. (Resumo).
- MELLO, M.I.V., HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n1, p.71-78, 1999.
- NEILD, D., CHAVES, G., MORA, N., BECONI, M.; AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.51, n.4; p.721-727, 1999.
- PEREZ MARCOS, C., SANCHEZ, R., PALÁCIO, M., PURSEL, V.G.; PEREZ GARCIA, T.; MARTIN RILLO, S. Effects of dilution rate on the motility and acrossome morphology of boar spermatozoa stores at 15 oC. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26, p.112-116, 1991.
- PETRUNKINA, A.M., VOLKER, G., WEITZE, K.F., BEYERBACH, M.; TOPFER-PETERSON, E.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology*, v.63, n.8, p.2278-2299, 2005.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E. Mamalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, sup.2, p.11-20, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, sup.2, p.2-10, 2006.
- RUVALCABA, J.A.G., CONDE MARTINEZ, P. Por que ocorrem problemas reprodutivos no cachaço?, *Suínos & Cia*, v.14, p.11-26, 2005
- SALGUEIRO, C.C.M., NUNES, J.F., OLIVEIRA, K.P.L. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, sup.1, n.5, p.156-160, 2002.
- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F., OLIVEIRA, R.V., PARENTE, J.C.B.; CAVALCANTE, J.M.M.; MELLO, M.M.C.; BRASIL, O.O.; FAUSTINO, L.R.; GONÇALVES, R.F.B.; BATISTA, C.A.P.M.; SOUZA, D.F.R.; ACCIOLY, M.P. Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102 ou TRIS, resfriado e mantido a 4 oC por 24 horas. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1, 2007, Curitiba. Anais ... Curitiba: 2007. p.149. (Resumo).
- SAS Statistical Analysis System. v.6.03 Cary: SAS Institute, 1988. 1028p.
- SILVA, T.F.P., ACKERMANN, C.L., PINHEIRO, F.T.S., SILVA, L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de gato doméstico. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1, 2007, Curitiba. Anais ... Curitiba: 2007. p.191. (Resumo).
- SLAWETA, R., SIKORSKA, J., STREZEZEK,



- J. The effect of storing semen at 15-18 oC for varying lengths of time on morphology and biological value of spermatozoa. *Medicin Weterinarae*, v.37, p.687-690, 1981.
- SNOECK, P.P.N., MELO, M.I.V., HENRY, M. Efeito da fixação no teste hiposmótico com água destilada. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1, 2007, Curitiba. Anais ... Curitiba: 2007. p.223. (Resumo).
- STORNELLI, M.C., STORNELLE, M.A., SAVIGNONE, C., BELUZAN, I.; ARAUZ, M.S.; de la SOTA, R.L. Uso de la técnica de la triple tinción para evaluar simultaneamente el estado acrosomal y la vitalidad em espermatozoides caninos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.3, p.464-466, 2001.
- TONIETO, S.R., JULIANO, F., COLLARES, T., TONIETO, R.A.; SCHMITT, E.; CORRÊA, M.N.; LUCIA Jr, T.; BIANCHI, I.; DESCHAMMPS, J.C. Influência do técnico na avaliação de espermatozoides suínos submetidos ao choque hiposmótico. In: I Congresso Latino Americano de Suinocultura, 1, 2002, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: 2002. p.193-194.
- TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amèlioration des conditions de conservation. 1996. 91p. Tese de Doctorat (Doutorado em Ciência da Vida) - Université François Rabelais de Tours, Tours, France.
- TONIOLLI, R., MEDEIROS, A.L.M., FIGUEIREDO, E.L. Morfologia dos espermatozoides de suíno, diluídos no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do ácido 3-indol acético. *Revista Ciência Animal*, v.9, n.2, p.61-65, 1999.
- UCHOA, D.C., SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Conservação do sêmen canino a 37 oC em um diluidor à base de água de coco ou líquido prostático autólogo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.324-325, 2003.
- 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.