



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CARLOS AUGUSTO ALVES MELANDA

**USO DO SPERM FILTER<sup>®</sup> PARA SEPARAÇÃO DO PLASMA  
SEMINAL E ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE ÁCIDO FÍTICO  
AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS**

CARLOS AUGUSTO ALVES MELANDA

**USO DO SPERM FILTER<sup>®</sup> PARA SEPARAÇÃO DO PLASMA  
SEMINAL E ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE ÁCIDO FÍTICO  
AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Maria Isabel Mello Martins

Londrina  
2018

CARLOS AUGUSTO ALVES MELANDA

**USO DO SPERM FILTER® PARA SEPARAÇÃO DO PLASMA  
SEMINAL E ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE ÁCIDO FÍTICO AO  
DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Isabel Mello Martins  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr Caio Abércio da Silva  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr Thales Ricardo Rigo Barreiros  
Universidade Estadual do Norte do Paraná –  
UNOPAR

Londrina, 09 de agosto de 2018.

## AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia ter sido concluída sem o precioso apoio de várias pessoas colocadas em meu caminho por Deus.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Maria Isabel Mello Martins, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que me orientou – neste trabalho e em todos aqueles que realizei desde o final da graduação. Muito obrigado por ter me corrigido quando necessário, sem nunca me desmotivar.

Ao professor Caio Abércio da Silva que propiciou meu contato, de forma comercial, com a granja, sem a qual não haveria como realizar o presente trabalho, assim como supriu financeiramente o estudo quando foi preciso.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado, especialmente à Anne Kemmer, à Myrian Hidalgo, à Beatriz Marques e ao Luiz Guilherme Corsi, cujo apoio e amizade foram essenciais em todos os momentos, principalmente nos momentos de dificuldade gerados no desenvolvimentos dos trabalhos para a realização dessa dissertação. Agradecer, ainda, as colegas de programa de pós, Evelyn e Jamile, pelo apoio incondicional prestado para realização do TBARS.

Por fim, agradeço à minha família pelo apoio incondicional, especialmente aos meus pais, Antonio Carlos e Deonice Melanda, pela base estrutural para chegar até aqui; ao meu irmão e minha cunhada, Gustavo e Allana, pelo apoio motivacional; e à minha noiva Keli, que me amparou nos momentos de estresse sem deixar que nosso amor fosse abalado.

MELANDA, Carlos Augusto Alves. **Uso do sperm filter® para separação do plasma seminal e adição do antioxidante ácido fítico ao diluente de refrigeração de sêmen de suínos.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O sêmen de suíno apresenta grande sensibilidade às técnicas de processamento quando comparado com outras espécies, seja no momento da separação do plasma seminal ou durante a criopreservação. A hipótese de que a utilização da filtração para a separação do plasma seminal ocasiona menores lesões de membrana nos espermatozoides de suínos e a ação do antioxidante ácido fítico mantém a viabilidade espermática após 96 horas de refrigeração, foi testada neste estudo, que tem como objetivo avaliar a eficiência da separação do plasma seminal por filtração no Sperm Filter®, assim como avaliar o efeito da adição de ácido fítico ao diluente de refrigeração de sêmen de suíno nas células espermáticas refrigeradas por até 96 horas. Para tal foram utilizados oito cachorros adultos, das raças Landrace, Pietrain, Large White, Duroce Cruzado com média de idade de 2 anos. A colheita dos ejaculados foi realizada por meio da técnica da mão enluvada e foram diluídos em meio Beltsville Thawing Solution (BTS). No artigo I as amostras diluídas foi divididas em três grupos, sendo: sêmen total + BTS (BTS TOTAL), (BTS CEN) sêmen + BTS centrifugado a 600g por 10 minutos, (BTS FIL) sêmen + BTS filtrado usando o Sperm Filter®; e no artigo II foram diluídos em seis grupos sendo três somente com BTS (BTS TOTAL, BTS CEN, BTS FIL), e três com BTS acrescido de ácido fítico (AF) na concentração de 0,5 mM (AF TOTAL, AF CEN e AF FIL) mantendo, nos dois artigos, a concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A avaliação das características dos espermatozoides foi realizada em cinco tempos: a fresco (D0), após a refrigeração à 17°C por 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4). A cinética espermática foi avaliada pelo sistema computadorizado CASA, morfologia espermática e integridade de membrana pela coloração eosina/nigrosina. A mensuração dos níveis de estresse oxidativo foi realizada pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estatística foi pela análise de variância associada ao teste de Tukey quando havia normalidade e homogeneidade e o teste de Kruskal-Wallis quando esses pressupostos não foram obtidos, realizada pelo Software Sigma Plot 11.0, sendo considerado nível de significância de 5%. No artigo I foi detectada uma queda nas características espermáticas durante a refrigeração por 96 horas, nos três grupos, sendo mais intensa nas centrifugadas e filtradas, entretanto, não foi diferente entre as amostras centrifugadas e filtradas. No artigo II os resultados demonstraram que a adição do ácido fítico na concentração de 0,5mMol ao BTS diminuiu a ação antioxidante somente na primeira hora após a colheita de sêmen. Portanto, pode-se concluir que: artigo I o Sperm filter® é uma alternativa efetiva para a separação do plasma seminal.e artigo II, a adição de 0.5Mmol de ácido fítico ao BTS promoveu a proteção da membrana plasmática, porém não foi suficiente para inibir a peroxidação lipídica durante a refrigeração por 96 horas.

**Palavras-chave:** Plasma seminal. Filtração. SpermFilter®. Antioxidante. Refrigeração. Cachaço.

MELANDA, Carlos Augusto Alves. **Addition of the antioxidant phytic acid in the swine semen refrigeration medium and replacement of the centrifugation by the filter for removal of seminal plasma.** 78 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Boar semen has great sensitivity to its processing compared to other species, either at the seminal plasma separation or during cryopreservation. The hypothesis that the use of filtration for separation of seminal plasma causes lower membrane damage in the spermatozoa of swine and the action of the antioxidant phytic acid maintains sperm viability after 96 hours of refrigeration, was tested in this study, which aims to evaluate the efficiency of separation of seminal plasma by filtration in Sperm Filter®, so to evaluate the effect of the addition of phytic acid to the refrigerant diluent of porcine semen on chilled sperm cells for up to 96 hours. Eight adults of the Landrace, Pietrain, Large White and Duroce Cruzado breeds with mean age of 2 years were used. The ejaculates were harvested using the gloved hand technique and were diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) extender. In the first part of the study the diluted samples were divided into three groups: total semen + BTS (BTS TOTAL), (BTS CEN) semen + BTS centrifuged at 600g for 10 minutes, (BTS FIL) semen + BTS filtered using Sperm Filter®; (BTS TOTAL, BTS CEN, BTS FIL), and three with BTS plus phytic acid (AF) at the concentration of 0.5 mM (TOTAL AF, AF CEN and AF FIL) maintaining, in both articles, the final concentration of  $50 \times 10^6$  spermatozoa / mL. The sperm characteristics were evaluated in five periods: fresh (D0), after cooling at 17 ° C for 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) and 96h (D4). Sperm kinetics were evaluated by the computerized system CASA, sperm morphology and membrane integrity by eosin / nigrosine staining. The measurement of oxidative stress levels was performed using the thiobarbituric acid reactive substances technique (TBARS). The statistical analysis was based on the analysis of variance associated with the Tukey's test when there was normality and homogeneity and the Kruskal-Wallis test when these assumptions were not obtained, performed by Software Sigma Plot 11.0, being considered a significance level of 5%. In article I, a decrease in the sperm characteristics during the 96 hour refrigeration in the three groups was detected, being more intense in the centrifuged and filtered, however, it was not different between the centrifuged and filtered samples. In the article II the results showed that the addition of the phytic acid in the concentration of 0.5mMol to the BTS decreased the antioxidant action only in the first hour after the semen harvest. Therefore, it can be concluded that: Article I Sperm filter® is an effective alternative for seminal plasma separation. Article II, the addition of 0.5Mmol of phytic acid to the BTS promoted protection of the plasma membrane, but was not sufficient to inhibit lipid peroxidation during refrigeration for 96 hours.

**Keywords:** Seminal plasma. Filtration. SpermFilter®. Antioxidant. Refrigeration. Boar.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO I

**Figura 1** Fluxograma do delineamento experimental. (FIL) Ejaculado Filtrado com uso do SpermFilter®, (CEN) Ejaculado Centrifugado a 600g por 10 min, (TOTAL) Ejaculado total. Todos a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides /mL diluídos/suspensos em BTS ..... 42

**Quadro 1** *Setup* utilizado no HTR-IVOS 20 para avaliação dos espermatozoides de suínos ..... 50

### ARTIGO II

**Figura 1** Fluxograma do delineamento experimental. (FIL) Filtrado com uso do SpermFilter®, (CEN) Centrifugado a 600g por 10 min, (AF) Ácido fólico na concentração de 0,5 mM adicionado ao meio diluente BTS. (TOTAL) Ejaculado total. Todos a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides /mL diluídos/suspensos em BTS ..... 63

**Quadro 1** *Setup* utilizado no HTR-IVOS 20 para avaliação dos espermatozoides de suínos ..... 71

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

- Tabela 1** Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen total (TOTAL), centrifugado a 600g/10 min (CEN) e filtrado em sperm filter® (FIL), em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) ..... 51
- Tabela 2** Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen total (Total), centrifugado a 600g/10 min (CEN) e filtrado em sperm filter® (FIL), em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) ..... 53
- Tabela 3** Média dos resultados da análise cinética de amostras de sêmen suíno total (TOTAL) em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 55
- Tabela 4** Média dos resultados da análise morfológica e avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) de amostras de sêmen suíno total (TOTAL), refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 55
- Tabela 5** Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen centrifugado (CEN) a 600g/10 min (CEN) em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) ..... 56
- Tabela 6** Média dos resultados da análise morfológica de amostras de sêmen suíno centrifugado a 600g/10 min (CEN) em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 56
- Tabela 7** Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen filtrado em sperm filter®

(FIL), em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) ..... 57

**Tabela 8** Média dos resultados da análise morfológica de amostras de sêmen suíno filtrado em sperm filter® (FIL), em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 58

## ARTIGO II

**Tabela 1** Média ± desvio padrão dos resultados da avaliação cinética pelo sistema CASA de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fólico) ou BTS (meio BTS puro), de sêmen total, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 72

**Tabela 2** Média ± desvio padrão dos resultados da análise morfológica e da análise de peroxidação lipídica pelo TBARS de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fólico) ou BTS (meio BTS puro), de sêmen total, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 72

**Tabela 3** Média ± desvio padrão dos resultados da avaliação cinética pelo sistema CASA de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fólico) ou BTS (meio BTS puro), centrifugado a 600g/10 min, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 73

**Tabela 4** Média ± desvio padrão dos resultados da análise morfológica e da análise de peroxidação lipídica pelo TBARS de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fólico) ou BTS (meio BTS puro), centrifugado a 600g/10 min, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 74

**Tabela 5** Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da avaliação cinética pelo sistema CASA de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fólico) ou BTS (meio BTS puro), filtrado com Sperm-filter<sup>®</sup>, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C..... 74

**Tabela 6** Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da análise morfológica e da análise de peroxidação lipídica pelo TBARS de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fólico) ou BTS (meio BTS puro) filtrado com Sperm-filter<sup>®</sup>, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C ..... 75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF CEN	BTS acrescido de ácido fítico com sêmen centrifugado
AF FIL	BTS acrescido de ácido fítico com sêmen filtrado
AF TOTAL	BTS acrescido de ácido fítico com sêmen total
AF	Ácido fítico
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
BTS CEN	BTS puro com sêmen centrifugado
BTS FIL	BTS puro com sêmen filtrado
BTS TOTAL	BTS puro com sêmen total
BTS	<i>Beltsville thawing solution</i>
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
CAT	Catalase
CEN	Sêmen centrifugado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ChA	Ácido Clorogênico
D0	Sêmen fresco
D1	24 horas após a refrigeração
D2	48 horas após a refrigeração
D3	72 horas após a refrigeração
D4	96 horas após a refrigeração
DEF MAIOR	Defeitos maiores
DEF MENOR	Defeitos menores
DEF TOTAIS	Defeitos totais
FIL	Sêmen filtrado
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IM	Integridade de membrana
LIN	Linearidade
MDA	Malondialdeído
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
NO	Oxido nítrico
O <sub>2</sub>	Dioxigênio singleto

OH	Radical hidroxila
ORP	Potencial De Redução Da Oxidação
RAPID	Espermatozoides rápidos
REPROA	Laboratório de Biotecnologias da Reprodução Animal
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
STR	Retiniliaridade
TAC	Capacidade Antioxidante Total
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TOTAL	Sêmen total
UDG	Unidades Disseminadoras de Genes
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VAP	Velocidade do percurso médio
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Progressiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	16
2.1	Considerações Gerais .....	16
2.2	Plasma Seminal .....	17
2.2.1	Remoção do Plasma Seminal .....	18
2.3	Diluyente .....	20
2.4	Criopreservação .....	20
2.5	Antioxidantes .....	22
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	36
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
4.1	OBJETIVO GERAL .....	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO .....	37
<b>5</b>	<b>ARTIGO I – USO DO SPERM FILTER® PARA SEPARAÇÃO DO PLASMA SEMINAL EM SUÍNOS</b> .....	38
	Resumo .....	38
	Abstract .....	39
	Introdução .....	40
	Material e Métodos .....	41
	Resultados .....	44
	Discussão .....	45
	Referências .....	47
<b>6</b>	<b>ARTIGO II – EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE ÁCIDO FÍTICO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS</b> .....	58
	Resumo .....	58
	Abstract .....	59

Introdução .....	60
Material e Métodos .....	61
Resultados .....	64
Discussão .....	65
Referências .....	67
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

A suinocultura tem apresentado um grande avanço quanto a produção de carne suína e para que se tenha maior incremento, novas biotecnologias da reprodução vem sendo aplicadas, dentre elas a inseminação artificial. Para que essa técnica seja mais eficiente na produção de leitões geneticamente superiores, faz-se necessário o uso de reprodutores que possuam boas características reprodutivas e machos com sêmen de qualidade superior com significativa viabilidade a fresco ou refrigerado. Assim, são requeridas pesquisas com a utilização de diluentes que mantenham ou melhorem as características espermáticas, por um período prolongado.

Wentz et al. (2000) descreveram, com base em doses comercializadas, que 51% das fêmeas, em manejo reprodutivo, eram inseminadas. No entanto, não existem referências atuais descritas que estimem se houve aumento desse valor. Um fato que pode interferir nesse índice é que não existem coletas de dados em relação a produção interna de doses nas unidades produtoras de leitões e centrais de inseminação. Sabe-se que boa parte do uso dessas doses são refrigeradas.

O sêmen suíno apresenta grande sensibilidade às técnicas de processamento do ejaculado comparado a outras espécies, seja no momento da separação do plasma seminal ou durante a criopreservação. Isto ocorre, porque os espermatozoides possuem em sua composição, alto teor de ácidos graxos poli-insaturados que são sensíveis ao estresse oxidativo (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR, 2009; CADAVID, 2010). Para evitar que as alterações causadas reduzam o potencial de fertilidade da amostra, o uso de antioxidantes no meio diluente tem exercido proteção sobre a membrana plasmática. O ácido fítico é um antioxidante que tem o efeito de inibir a formação de radicais hidroxila (OH) não sendo ainda testado como alternativa para preservar a viabilidade dos espermatozoides de suínos durante a refrigeração.

Além disso, para potencializar a reprodução e produção de suínos, estudos têm buscado reduzir o volume da dose e o número de espermatozoides por dose inseminante, com o propósito também de otimizar o uso do reprodutor (RIESENBECK et al., 2015; YESTE, 2015). Portanto, a separação do plasma seminal é essencial para aumentar a concentração de espermatozoides (GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012), além de poder contribuir para o processo de criopreservação, uma vez que o plasma seminal em contato com o espermatozoide por tempo prolongado pode ser deletério às células (SARAVIA et al., 2009; BARRANCO et al., 2015). Como o método convencional de centrifugação espermática pode

causar dano às células, alternativas como a utilização do filtro têm sido desenvolvidas, principalmente para equinos (ALVARENGA et al., 2010; RAMIRES NETO et al., 2013).

O conhecimento da resposta das células espermáticas dos suínos às várias condições estressantes durante seu processamento é necessário para a formulação de protocolos de refrigeração e elaboração de diluentes acrescidos com antioxidantes mais apropriados. De maneira adicional, determinar novas alternativas para a remoção do plasma seminal, também são importantes para o sucesso na preservação dessas células.

## 2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 *Considerações Gerais*

O consumo de carne suína vem aumentando no mercado mundial, mais evidentemente em partes da América Latina, Ásia e Oceania, locais onde o consumo *per capita* está inferior à média mundial. A produção, na maior parte destes territórios, não acompanhou a crescente demanda por proteína suína. Por sua vez, o preço, com valores competitivos no mercado interno, gerou um maior volume de importações nestas regiões, papel assumido em partes, pelos exportadores: Brasil e EUA (USDA, 2018).

O Brasil, em abril de 2018, foi o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína (USDA, 2018). No entanto, o principal destino da produção do setor permaneceu em território nacional, com 80,4% da produção destinado ao mercado interno, pois é a terceira proteína mais consumida no país (GUIMARÃES et al., 2017). Para ter capacidade de suprir essa demanda da suinocultura, as biotécnicas da reprodução devem ser eficientes.

A indústria suinícola vem aumentando nos últimos 40 anos, e a inseminação artificial foi um dos instrumentos que contribuiu para o progresso da produção de suínos (DYCK et al., 2011). A tecnologia de refrigeração do sêmen também contribuiu significativamente, permitindo o transporte e manutenção da viabilidade espermática por mais tempo, proporcionando uma variação e aprimoramento na seleção genética (MARTINS et al., 2014, YESTE, 2015).

A demanda por sêmen de qualidade tem se tornado cada vez mais relevante e a disseminação de novas biotecnologias direcionam para um nível tecnológico mais alto nas centrais de colheita (RIESENBECK et al., 2015). Com isso, vem surgindo setores ainda mais especializados, como as Unidades Disseminadoras de Genes (UDG), e novos conceitos têm sido disseminados no setor produtivo, como o de genética líquida (Agrocere PIC<sup>®</sup> Brasil - Rio Claro, São Paulo), que faz uso da comercialização de doses de sêmen refrigerado, transmitindo às unidades de produção genes de animais superiores, sem haver o custo de alojar um cachaço na própria granja.

Atualmente, na biotecnologia espermática, as diferenças na criotolerância ainda permanecem incertas (LI et al., 2018), tanto nos resultados individuais de machos de diferentes raças e diferentes composições genéticas (McPHERSON, 2016; ZAJA et al., 2016) quanto para a fração espermática dentro do ejaculado do próprio animal (LI et al., 2018).

Sabe-se que a utilização de diluentes comerciais para armazenamento de sêmen suíno por curtos períodos é importante para aumentar a longevidade dos espermatozoides com o mínimo de deterioração da função espermática (BOGDAN et al., 2018). Porém, ainda existem alguns entraves que durante este processo provocam alterações espermáticas induzindo um menor potencial de fertilização. Nos espermatozoides de suínos, o dano causado pela criopreservação é mais grave, possivelmente pela formação inadequada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pela acentuada peroxidação lipídica da membrana (CEROLINI et al., 2000). Assim, ajustes e a adição de antioxidantes nos diluentes para a refrigeração são alternativas importantes para aumentar a sua eficiência.

Outro desafio observado na biotecnologia do sêmen de suíno é a grande quantidade de plasma seminal encontrado no ejaculado. Muitos autores demonstraram o efeito deletério deste quando em contato por um longo período de tempo com as células espermáticas, principalmente, durante o processo de criopreservação (SARAVIA et al., 2009; BARRANCO et al., 2015). Contudo, a separação do plasma seminal pelos métodos convencionais também gera consideráveis danos às células espermáticas, apresentando mais um obstáculo para a refrigeração espermática. Portanto, estudos para realizar a separação do plasma seminal com métodos alternativos, a fim de minimizar as lesões dos espermatozoides, são de extrema importância e podem colaborar para aumentar a viabilidade do sêmen que precisa passar pelo processo de refrigeração.

## ***2.2 Plasma Seminal***

O plasma seminal é a secreção proveniente das glândulas acessórias, como a próstata, bulbo uretrais e vesiculares nos suínos e em menor quantidade pelos testículos e epidídimo. Apresenta a importante função de auxiliar o transporte dos espermatozoides pelo trato genital feminino, permitindo condições viáveis para a fertilização, além de fornecer substratos metabólicos para as células espermáticas e participar do processo de maturação (ALKMIN et al., 2014; LIU et al., 2018).

Estudos afirmam que devido à composição variável entre as espécies e indivíduos, o plasma seminal pode ser benéfico ou prejudicial para a qualidade do sêmen, dependendo do tempo de contato com as células (SARAIVA et al., 2009; ALKMIN et al., 2014). Durante o processamento do sêmen para a refrigeração, as células espermáticas ficam expostas ao plasma seminal por um tempo maior do que se fosse utilizar o sêmen a fresco. Em trabalhos realizados por Okazaki et al. (2009) e Li et al. (2018), a presença de plasma seminal

durante o processo de refrigeração se mostrou deletério para células, porém, a adição do mesmo no momento da descongelação se mostrou essencial para a viabilidade dos espermatozoides.

Estudos demonstram que o plasma seminal pode aumentar a criotolerância dos espermatozoides, aumentando a estabilidade da membrana plasmática, pois representa a fração do ejaculado com maior capacidade antioxidante e sua remoção torna as células espermáticas mais vulneráveis à lipoperoxidação devido ao esgotamento dos fatores responsáveis pela captação de espécies reativas de oxigênio (JUYENA; STELLETTA, 2012; GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; MARSHBURN et al., 2014). Contudo, a remoção de plasma seminal é um procedimento consagrado em protocolos tradicionais de criopreservação de sêmen de suíno, pois esta remoção também se faz essencial para aumentar a concentração de espermatozoides (GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012), otimizando o processo de inseminação artificial (RIESENBECK et al., 2015).

### *2.2.1 Remoção do Plasma Seminal*

#### *- Centrifugação*

Atualmente a centrifugação é um método de eleição para a retirada do plasma seminal, pois se mostra relativamente eficaz e simples para recuperar espermatozoides. No entanto, o processo também causa danos consideráveis às células, sendo a mais comum a lesão de membrana e acrossomo, e o estímulo à hiperativação precoce, devido à força excêntrica gerada (HALLAP et al., 2004; GADEA et al., 2005; RAMIRES NETO et al., 2013). Nos anos de 1988 a centrifugação foi considerada negativa para as células normais por interferir na capacidade de fertilização, uma vez que o excesso de excitação pode produzir ROS e reduzir a motilidade dos espermatozoides (AITKEN; CLARKSON, 1988).

A taxa de recuperação dos espermatozoides também é um fator preocupante na centrifugação, pois estudos relataram perda de até 25% das células no sobrenadante (HALLAP et al., 2004; AURICH, 2008; LOOMIS, 2006). Parte desta dificuldade é observada como consequência da duração do processo com a força de centrifugação, onde forças muito baixas comprometem a formação do pellet e recuperação das células, enquanto forças muito altas podem formar um sedimento pela aderência indesejada dos espermatozoides (VIDAMENT et al., 2001; WAITE et al., 2008; HOOGEWIJS et al., 2010).

As características da centrifugação (temperatura, força g e duração) foram estudadas por vários autores (SALAMON, 1973; SCHRADER; TREU; HAHN, 1977; SAMOUILIDIS et al., 1996; CARVAJAL et al., 2001; PETZ et al., 2002;) com o objetivo de reduzir os efeitos negativos nos espermatozoides. Porém, há discordância quanto a influência do método de centrifugação na qualidade do sêmen de suínos (GOSALVEZ et al., 2004).

Nos protocolos de criopreservação do sêmen de suínos, a centrifugação geralmente é conduzida à temperatura de 15°C, pois estudos demonstraram que protocolos utilizando 24°C (temperatura ambiente), mesmo que sendo mais barato e menos sofisticado por não necessitar de centrífuga refrigerada, apresentaram resultados insatisfatórios quanto à motilidade e a integridade de membrana (BIANCHI et al., 2008).

#### *- Filtração*

O método de separação do plasma seminal pela filtração, relativamente recente, tem se mostrado uma alternativa viável para animais que apresenta baixa qualidade espermática. Esta técnica já tem sido utilizada em outras espécies (ALVARENGA et al., 2010 - equino; RAMIRES NETO et al., 2013 - equino; CAMPANHOLI et al., 2016 - bovino; ALBUQUERQUE et al., 2017 – búfalo; LARENTIS et al., 2018 - equino), contudo, não foram encontrados estudos em suínos.

Para realização da filtração espermática é utilizado o dispositivo Sperm Filter<sup>®</sup> (BotuPharma/Pat req. US2010/0099075, Botucatu, São Paulo, Brasil), que permite a passagem de 90 a 95% do plasma seminal e retém apenas os espermatozoides, por meio de poros e capilares. O filtro é constituído por uma membrana hidrofílica sintética com poros de 2 µm, apresenta 12 cm de diâmetro e está ligado a um anel de plástico que pode conter até 50 mL de sêmen para filtração. As células retidas podem ser ressuspensas com diluente até atingir a concentração espermática desejada (RAMIRES NETO et al., 2013).

A vantagem do filtro é ser prático e ter melhor taxa de recuperação espermática (89%), quando comparado com a centrifugação (81%), parecendo não causar danos aos espermatozoides, pois, não foram identificadas diferenças na cinética espermática e integridade da membrana plasmática em comparação com o sêmen de equino centrifugado refrigerado por 24 horas e fresco (ALVARENGA et al., 2012; RAMIRES NETO et al., 2013). Além disso, o filtro deixa com que as bactérias passem pelos poros, sendo observada uma redução do crescimento bacteriano com os espermatozoides que permaneceram retidos (ALVARENGA et al., 2012).

### 2.3 *Diluyente*

O diluyente deve manter e até aumentar a viabilidade espermática durante a preservação do sêmen (WOELDERS, 1992; BOGDAN et al., 2018). Sua função é fornecer nutrientes para o metabolismo dos espermatozoides; estabilizar as membranas espermáticas; manter o equilíbrio osmótico; neutralizar os resíduos metabólicos; ajustar as alterações de pH, servindo como solução tampão; prevenir a capacitação; proteger a célula contra choque térmico durante a refrigeração; e combater possíveis contaminações bacterianas para tornar a vida útil do espermatozoide maior (FLOWERS, 1997; HU; LI; ZHANG, 2009; SHAN et al., 2015).

Como fonte de energia o diluyente pode conter gema de ovo, leite ou água de coco, assim como glucose, lactose e citrato de sódio. Possui antimicrobianos, como a amicacina, penicilina, gentamicina, entre outros. Como estabilizador de membrana podem ser utilizados BSA (albumina de soro bovino) e o ácido etilenodiaminotetraacético. Acredita-se que o uso de detergentes a base de SDS (duodecil sulfato de sódio), como Equex STM Paste<sup>®</sup> e Orvus ES Paste<sup>®</sup> (OEP), dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, o que aumenta o potencial de penetração proteica na membrana plasmática e, por consequência, eleva a sua ação protetora (HOLT, 2000a, 2000b; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O meio mais utilizado para diluição e conservação do sêmen de suíno sobre refrigeração é o Beltsville Thawing Solution - BTS (WOELDERS, 1992), que tem demonstrado resultados consistentes por cinco até dez dias de refrigeração (VASCONCELOS et al., 2001; KAEOKET et al., 2010), possui baixo custo e número limitado de ingredientes, sendo de fácil utilização. De acordo com Karageorgiou et al. (2016), os diluentes de sêmen de suínos são classificados pelos fornecedores comerciais em três categorias: extensores de curto prazo, de médio prazo e de longo prazo de acordo com sua capacidade de preservação (1-2, 3-4 e 7-10 dias após a coleta, respectivamente).

### 2.4 *Criopreservação*

A criopreservação é o ato de refrigerar ou congelar para preservar as células, por meio da diminuição do metabolismo. A refrigeração, para a célula espermática de suíno, consiste na manutenção do sêmen a 15-17°C, geralmente adicionado a um diluyente. É um método indicado para utilização em biotécnicas reprodutivas e, quando necessário, para o transporte do ejaculado para laboratórios especializados, podendo ser realizado em questão de

2 horas, ou até 24 horas (SCHÄFER et al., 2017). O armazenamento do sêmen também requer segurança na qualidade, pela prerrogativa de utilizar a amostra em um maior número de fêmeas, buscando reduzir o número de espermatozoides por dose inseminante (RIESENBECK et al., 2015; YESTE, 2015).

O ejaculado de suínos pode ser preservado durante 14 dias na temperatura de 15 a 18°C (JOHNSON et al., 2000). A diminuição da temperatura faz com que os lipídeos da membrana se alterem, passando da fase líquida para gel, o que resulta em uma organização mais rígida da membrana (WATSON, 2000; LEAHY; GADELLA 2011; VADNAIS; ALTHOUSE 2011; SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015). Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é exposta a inúmeros fatores estressantes, que podem danificar a membrana espermática resultando em diminuição da motilidade espermática, da viabilidade e da capacidade de fertilização. Estas ocorrem por razões de choque térmico durante a refrigeração do sêmen, choque osmótico, estresse oxidativo por oxigênio reativo ou ainda ao estresse ligado à adição e ação do crioprotetor (WATSON, 2000; PEÑA et al., 2005; KAEOKET et al. 2010).

O espermatozoide de suíno é frágil ao choque pelo frio pela diferença na composição de sua membrana, que contém altos níveis de fosfolipídios insaturados e baixos níveis de colesterol (JOHNSON et al. 2000; CASAS e ALTHOUSE, 2013; SILVA et al., 2015). A refrigeração reduz o metabolismo das células, diminui os gastos energéticos e contribui para a preservação do espermatozoide. Contudo, da mesma forma que ocorre essa diminuição das reações bioquímicas celulares, também pode acelerar outras, gerando injúrias à célula ou até mesmo levar a sua morte (WATSON, 1995; HOLT, 2000a). As alterações “tipo capacitação” ou “falsa capacitação”, derivadas do choque térmico, também causam alteração do padrão de motilidade e podem culminar numa reação acrossômica “espontânea”, porém diferindo bioquimicamente e morfológicamente da reação acrossômica induzida pela zona pelúcida, tornando a célula espermática inviável para a fertilização (HOLT, 2000a), pois conduzem a aumento da permeabilidade da membrana e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (MEDEIROS et al., 2002).

O conhecimento das propriedades físicas e biofísicas dos espermatozoides são importantes, pois ambas são afetadas durante a criopreservação. Durante o processo podem ocorrer alterações na permeabilidade da membrana pelo estresse osmótico. Gilmore et al. (1996) determinaram 1,03 pm/min a taxa de permeação de água pela membrana plasmática das células de suínos. A condutividade hidráulica dos espermatozoides de suínos pela membrana plasmática, tais como a permeabilidade de soluto (crioprotetores), são essenciais

para determinar as melhores taxas de adição e remoção dos diluentes de refrigeração. Para evitar que as alterações causadas pela criopreservação causem mais danos aos espermatozoides, o uso de antioxidantes no meio diluente de refrigeração tem sido utilizado.

## 2.5 *Antioxidantes*

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes por causa dos efeitos que radicais livres causam quando são produzidos naturalmente ou por algum desequilíbrio biológico; embora, a oxidação seja parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo das células. Em pequenas quantidades, os radicais livres desempenham papel essencial na capacitação espermática, na hiperativação da motilidade espermática e na reação acrossômica (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR, 2009; MENEGAT et al., 2017). Somente quando as concentrações de ROS (espécie reativo de oxigênio) excedem o nível de limiar é que se tornam prejudiciais (RHOADES; PFLANZER, 1996; NOGUEIRA et al. 2013) causando peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas das membranas, enzimas, carboidratos e DNA dos espermatozoides (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O sêmen de suíno tem como característica deter grande volume e ter em sua composição alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (CADAVID, 2010). Os principais alvos das ROS são os lipídios contidos na membrana celular, tornando os espermatozoides mais sensíveis à peroxidação lipídica na presença de O<sub>2</sub>, modificando a permeabilidade e fluidez da membrana (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR, 2009). As células espermáticas possuem baixa capacidade antioxidativa e são incapazes de resintetizar seus componentes de membrana, embora este não seja o único mecanismo pelo qual a função do espermatozoide é prejudicada pela ROS (JONES; MANN, 1977).

Os espermatozoides de mamíferos possuem enzimas com ação antioxidantes (Superóxido dismutase - SOD, Glutaciona peroxidase - GSH-Px, glutaciona redutase e catalase- CAT) com a ação de neutralizar espécies reativas nocivas no sêmen (BILODEAU et al., 2001; HU; LI; ZHANG, 2009), contudo o ejaculado de suíno é caracterizado pela presença de baixa atividade de GSH-Px e ausência de catalase (GADEA et al., 2004; ORZOŁEK et al., 2013), o que o torna ainda mais sensível. Além disso, devido ao componente citoplasmático, que contém os antioxidantes, ser de tamanho reduzido, esta capacidade antioxidante é limitada nas células espermáticas (SARIÖZKAN et al., 2009).

O choque térmico nos espermatozoides está associado ao estresse oxidativo, sendo a membrana plasmática a primeira estrutura a sofrer os efeitos prejudiciais induzidos

pela criopreservação, resultando em perda irreversível de sua função (BAILEY et al., 2008; VALLORANI et al., 2010). A produção de oxigênio intracelular é vital para a fisiologia celular, necessária para hiperativação, capacitação, reação acrossomal e eventos de ligação de zona a ocorrer (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992, 1995; KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996; HERRERO DE LAMIRANDE; GAGNON, 2003), porém, o oxigênio é convertido em ROS, o qual é um composto químico resultante da ativação ou redução do oxigênio molecular (dioxigênio,  $O_2$ ) ou derivados dos produtos da redução, que liberam peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o dioxigênio singlete ( $O_2$ ) e o radical hidroxila (OH).

As ROS podem causar dano generalizado ( $H_2O_2$ ) ou local (OH) na célula. As alterações causadas podem reduzir o potencial de fertilidade, causando danos ao DNA, perda de motilidade causadas por alteração em peça intermediária, reestruturação acrossomal, modificação no evento de fusão de oócitos, alterações no citoesqueleto de esperma e danos nas mitocôndrias, as quais são a principal fonte da produção de ROS, resultante pelo processo da respiração (AITKEN; CLARKSON, 1988; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995; LOPES et al., 1998; EVENSON; WIXON, 2006; PENÃ et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Também podem levar a indução de apoptose por altas concentrações de óxido Nítrico (NO) (MORAN et al., 2008) ou liberar proteínas pré apoptóticas que iniciam a capacitação e a morte celular (MISHRA; SHANA, 2005).

O estresse oxidativo e a consequente produção das ROS, pode ser bloqueado, pelo menos em parte, com a atuação de antioxidantes, seja de maneira endógena, pelo plasma seminal, sendo administrado por via oral, ou exógeno, adicionado aos diluentes de refrigeração (TAYLOR, 2001). Portanto, os antioxidantes são utilizados na tentativa de melhorar a qualidade dos espermatozoides após a criopreservação e podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (BATHGATE, 2011).

O uso de antioxidantes, adicionado ao diluente, visa retardar ou prevenir a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989), exercendo um efeito protetor sobre a membrana plasmática, sendo capazes de manter a atividade metabólica e a viabilidade celular (BECONI et al., 1993). Efeitos da suplementação de antioxidantes têm sido descritos em diluentes de sêmen de várias espécies (AITKEN; CLARKSON, 1988 – humanos; HATAMOTO et al., 2006 – cães; GADEA et al., 2007 – bovinos; FREITAS et al., 2016 – Equino; ALLAI et al., 2018 - carneiro).

Os antioxidantes não enzimáticos, adicionados ao alimento, no intuito de aumentar a concentração de antioxidantes no plasma seminal, têm demonstrado que os níveis não são benéficos, portanto a melhor solução seria a adição desses componentes nos diluentes

espermáticos no ejaculado de suínos (PEÑA et al., 2004; GROSSFELD et al., 2008). O uso na nutrição já apresenta descrição bibliográfica, como no caso do selênio (SURAI; FISININ, 2015) e da vitamina E (QING et al., 2017).

Deve-se ressaltar que a proteção antioxidante parece ser muito específica à espécie. Portanto, a identificação de antioxidantes eficazes para cada espécie é essencial para realizar os protocolos mais adequados para melhorar as características morfofuncionais dos espermatozoides e para minimizar lesões oxidativas que possam afetar negativamente a capacidade de fertilização (VALLORANI et al., 2010).

#### - *Ácido Fítico*

O ácido fítico é um substrato da enzima fitase, também conhecido como *myo*-inositol hexakisfosfato ou IP<sub>6</sub> (ANGEL; TAMIM; APPLGATE, 2002) e constitui cerca de 1-5% do peso da maioria dos cereais, nozes, leguminosas, sementes oleaginosas, esporos e pólen (GRAF; EATON, 1990). Sua principal função é a estocagem de fosfatos como fonte de energia e antioxidante para a germinação da semente, visto que representa até 80% do total de fósforo nas sementes (RABOY, 2003).

Seu efeito antioxidante é devido à sua capacidade de inibir a formação de radicais hidroxila (OH) e derivam de sua afinidade de ligação relativamente alta para o ferro, fazendo com que eles se tornem inativos cataliticamente (GRAF; EATON, 1990; STODOLAK et al., 2007; HARBACH et al., 2007; CANAN et al., 2011).

Humanos e suínos possuem degradação e absorção do IP<sub>6</sub> semelhantes, devido a isso, os suínos se tornam modelo experimental mais adequado para o estudo dos efeitos do IP<sub>6</sub> no câncer, nas doenças inflamatórias e em outras patologias (SILVA, BRACARENSE 2016). O trabalho elencou ainda, diversos efeitos atribuídos ao ácido fítico, o qual age inibindo condições patológicas e chega a ter ação antineoplásica. O mesmo grupo mostrou em um outro estudo, que o ácido fítico diminuiu significativamente as alterações morfológicas induzidas por micotoxinas atuantes no jejuno de suínos. (SILVA, GEREZ, BRACARENSE, 2014).

O uso de antioxidantes, como o ácido fítico, vem sendo pesquisado nas diferentes áreas da suinocultura, como por exemplo, na nutrição (FILGUEIRAS; SOARES; SHIMOKOMAKI, 2009) avaliando seus efeitos na integridade de membrana de células epiteliais intestinais de suínos, assim como seus efeitos sobre os ácidos graxos insaturados,

inibindo a peroxidação lipídica, o que contribuiu para a preservação da qualidade da carne e aumentando a vida de prateleira (COSTA et al., 2011).

Apesar de vários artigos publicados destacarem a ação antioxidante do ácido fólico na dieta dos animais (OLIVEIRA, 2012; PACHECO et al., 2012) não foram encontrados na bibliografia consultada trabalhos que objetivassem a utilização deste antioxidante diretamente no diluente do sêmen.

#### *-Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)*

O método que quantifica o estresse oxidativo pode ser feita de forma direta ou indireta. Nas técnicas diretas são descritos testes de redução do citocromo C, sondas fluorescentes e potencial de redução da oxidação (ORP). Nas indiretas estão incluídos os testes de capacidade antioxidante total (TAC) e peroxidação lipídica. (AGARWAL; QIU; SHARMA, 2018).

A metodologia mais utilizada para mensurar a peroxidação lipídica em espermatozoides de mamíferos é o método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A qual tem como princípio utilizar o ácido tiobarbitúrico (TBA) para aferir a concentração de malondialdeído (MDA), um produto de reação de peroxidação lipídica. (AITKEN et al. 1993; BAUMBER et al. 2000). A vantagem deste método é o baixo custo e fácil execução. Em contrapartida, ela fornece apenas uma medida indireta da peroxidação lipídica, por se tratar de um método pouco elaborado, não oferecem resolução das alterações da membrana (PAP et al., 1999).

Em estudos descritos utilizando a técnica TBARS em suínos, Mendez et al. (2013), avaliaram a adição de IGF-I à doses de sêmen de suínos em diferentes concentrações de vitamina E armazenadas à 15°C. As amostras foram avaliadas à fresco e após 24 e 72h de armazenamento à 15°C; o estudo concluiu que a adição de 400 mg / mL de vitamina E reduz a produção de MDA em jejum sem soro a 15°C por 72 h, independentemente da presença do aditivo IGF-I. Em trabalho recente, Pereira et al (2018), investigaram o potencial antioxidante do ácido clorogênico (ChA) em sêmen de suínos armazenados à 15°C. As doses foram processadas para inseminação em diferentes concentrações de ChA ou vitamina E para controle positivo e analisados após 0, 24 e 72 horas de armazenamento; os resultados demonstraram que tanto o ChA como a vitamina E foram igualmente eficientes no aumento da capacidade antioxidante do sêmen, reduzindo os níveis de malondialdeído antes e depois de 72 horas de armazenamento.

Estudos estes demonstraram que a técnica do TBARS é um método eficiente e de baixa dificuldade de execução para avaliar a peroxidação lipídica em amostras de sêmen refrigeradas.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v.9, p. 367-376, 1988.
- ALBUQUERQUE, R. S.; MORAIS, R.; REIS, N. A.; MIRANDA, M.S.; DIAS, E.A.R.; MONTEIRO, F. M.; PAZ, C.C.P.; NICHI, M.; KAWAI, G.K.V.; DELLA ´AQUA, C.P.F.; PAPA, F.O.; VIANA, R.B.; GIMENES, L.U. Comparison of two methods of seminal plasma removal on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**. V, 52, p. 905–910, 2017.
- ALLAI, L.; BENMOULA, A; MAIA, M.S.; NASSER, B.; AMIRI, B.El. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science**, 192, 6-17, 2018.
- ALKMIN, D.V.; PEREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.;PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. **Cryobiology** 69, 203-210. 2014.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; KIEVITSBOSCH, T. ; CHAVES, M. M. B. C.; RAMIRES NETO, C. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Maryland Heights, v. 32, p. 424-429, 2012.
- ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; MAGALHÃES, L.C.; PAPA, F.O. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.121; p. 186-187, 2010.
- ANGEL, R.; TAMIM, N.M.;APPLEGATE, T.J. et al. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 471-480, 2002.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, p. 268-275, 2008.
- AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M.M. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 3, p. 553–561, 2009.
- BAILEY, J.L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BREQUE, C.; DOBRINSKI, INA.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251–1259, 2008
- BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATIÑO, C.; ALKMIN, D.V.; CERON, J.J.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility. **Andrology**, v. 3, p. 315-320. 2015.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **QuimicaNova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BATHGATE, R. Antioxidant Mechanisms and their Benefit on Post-thaw Boar Sperm Quality. **Reproduction Domestic Animal**, v. 46, n. 2, p. 23–25, 2011.

BECONI, M. T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHIO, M. A. Effect of natural antioxidant on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R. R. da; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORREA, E.K.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C; CORREA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation, **Theriogenology**, v. 69, p. 632–638, 2008.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M. A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.

BOGDAN, L.; CENARIU, M.; BORZAN, M.; CIUPE, S.; SZABO, L.; PALL, E. Liquid storage of boar semen using commercial extenders. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Veterinary Medicine**, v. 75, p. 66-72, 2018.

CADAVID, V. G. Efeito da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a criopreservação do sêmen de cachacos. Dissertação de mestrado apresentada Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

CAMPANHOLI, S.P.; MONTEIRO, F.M.; RIBEIRO DIAS, E.A.; MERCADANTE, M.E.Z.; de PAZ, C.C.P.; DELL’AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; DELL’AQUA, C.D.P.F.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Effect of seminal plasma removal prior to cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility, **Theriogenology**, v. 89, p. 114-121, 2016.

CANAN, C.; CRUZ, F.T.L.; DELAROZA F.; CASAGRANDE R.; SARMENTO, C.P.M.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1057-1063, 2011.

CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; LUCAS, X.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J. Effect of the centrifugation regimes on the viability and penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa [abstract]. **Theriogenology**, v. 55, p. 302, 2001.

CASAS, I.; ALTHOUSE, G.C. The protective effect of a 17 °C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 °C. **Cryobiology**, v. 66, p. 69–75, 2013.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.

COSTA, M.C.R.; SILVA, C.A.; BRIDI, A.M.; FONSECA, N.A.M.; OBA, A.; SILVA, R.A.M.; SILVA, P.A.; YWAZAKI, M.S.; DALTO, D.B. Estabilidade lipídica do pernil e da linguiça frescal de suínos tratados com dietas com alta concentração de ácido fítico. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32, p. 1863–1872, 2011

- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 15-20, 1995.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386, 1992.
- DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.R.; NOVAK, S.; RUIZ-SANCHEZ, A.; PATTERSON, J.; DIXON, W.T. Biological markers of boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 55-58, 2011.
- EVENSON, D.P.; WIXON, R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 4, p. 466-472, 2006.
- FILGUEIRAS, C. T.; SOARES, A. L.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1787-1791, 2009.
- FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 67-78, 1997.
- FREITAS, M.L.; BOUÉRES, C.S.; PIGNATARO, T.A.; OLIVEIRA, F.J.G.; VIU, M.A.O.; OLIVEIRA, R.A. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 46, p. 1-6, 2016.
- GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A.; MATÁS, P.C.C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation—effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62, p. 690–701, 2004.
- GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GRULLÓN, L.A.; GARDÓN, J.C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bell spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 40-49, 2007.
- GADEA, J.; MARTÍNEZ-MIRÓ, S.; DECUADRO-HANSEN, G.; MATÁS, C. 92 evaluation of boar sperm functionality after a cushioned centrifugation technique. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p. 154, 2005.
- GILMORE, J. A.; JUNYING, DU.; JUN, T.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p.87-95, 1996
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCÉ, E.; DE MERCADO, E. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation, **Animal Reproduction Science**, v. 133, p. 109–116, 2012.
- GOSALVEZ, L.F.; VALDELVIRA, J.J.; ALVARIÑO, J.M.R.; AVEROS, X.; BABOT, D. Quality of frozen semen from crossbred boars (Ibérico, Landrace) related to centrifugation methodology. **Journal of Swine Health and Production**, v. 12, n. 2, p. 66-70, 2004.
- GRAF, E., EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 61–69, 1990.

- GROSSFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v. 70, p. 1225–1233, 2008.
- GUIMARÃES, D. D.; AMARAL, G. F.; MAIA, G. B. DA S.; LEMOS, M. L. F.; ITO, M.; CUSTODIO, S. Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 45, p. 85-136, 2017.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 513.
- HALLAP, T.; HÅÅRD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 3-4, p. 702-713, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Clarendon Press**, v. 543, 1989.
- HARBACH, A.P.R.; COSTA, M.C.R.; SOARES, A.L.; BRIDI, A.M.; SHIMOKOMAKI, M.; SILVA, C.A.; IDA, E.I. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1630-1633, 2007.
- HATAMOTO, L.K.; BAPTISTA SOBRINHO, C.A.; NICHI, M.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamine E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.
- HERRERO, M.B.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 419–425, 2003.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000a.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000b.
- HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; VliegHER, S.; VANHAESEBROUCK, E.; SCHAUWER, C.; GOVAERE, J.; THYS, M.; HOFACK, G.; SOOM, A. V.; KRUIF, A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. **Theriogenology**, New York, v. 74, p. 118-126, 2010.
- HU, J. H.; LI, Q. W.; ZHANG, T. Effect of gynostemma pentaphyllum polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. **Cryobiology**, v. 59, p. 244-249, 2009.
- JOHNSON, L.; WEITZE, K.; FISER, P.; MAXWELL, W. Storage of boar semen, **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.
- JONES, R.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 255–260, 1977.

JUYENA, N.S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p.536-551. 2012.

KAEOKET, K.; SRISOWANNA, T.; WICHAIDIT, U.; CHANAPIWAT, P.; MANEE-IN, S. Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, p. 257-263, 2010.

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 Veterinary Brno**, v. 85, p. 23–31, 2016.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 151-157, 1996.

LARENTIS G.R.; CAMOZZATO, G.C.; BASTOS, H.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Equine sperm selection by synthetic membrane filter. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 63, p. 69-73, 2018.

LEAHY, T.; GADELLA, B.M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, p.759–778, 2011.

LI, J.; BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MOLINA, M.F.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I.; ROCA, J. Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. **Theriogenology**, v. 107, p. 27-35, 2018.

LI, J.; ROCA, J.; PÉREZ-PATINO, C.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? **Animal Reproduction Science**, In Press, Accepted Manuscript, Available online 20 June 2018.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 22, p. 663-676, 2006.

LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 896–900, 1998.

MARSHBURN, P. B.; GIDDINGS, A.; CAUSBY, S.; MATTHEWS, M. L.; USADI, R. S.; STEUERWALD, N.; HURST, B. S. Influence of ejaculatory abstinence on seminal total antioxidant capacity and sperm membrane lipid peroxidation. **Fertility and Sterility**, v. 102, p. 705–710, 2014.

MARTINS, S. M. M. K.; DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; BRESSAN, F. F.; PUGINE, S. M. P.; MELO, M. P.; CHIARATTI, M. R.; MARINO, C. T.; MORETTI, A. S.; ARRUDA, R. P. Organic selenium supplementation increases PHGPx but does not improve viability in chilled boar semen. **Andrologia**, v. 47, n. 1, 2014.

McPHERSON, F.J. Analyses of boar semen samples submitted to an independent andrology laboratory. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 100, 2016.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 327-344, 2002.

MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BORTOLIN, R.C.; MENEZES, T.A.; VARGAS, A.R.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F.; BORTOLOZZO, F.P. Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 179, p. 67-79, 2017.

MISHRA, D.P.; SHANA, C. Estrogen induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6181-6196, 2005.

MORAN, J.M.; MADEJON, L.; ORTEGA, F. C.; PEÑA, F.J. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 91-96, 2008.

NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B; BENDER, E.S.C.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista eletrônica de Veterinária**, v. 15, p. 01, 2013.

OKAZAKI, T.; ABE, S; YOSHIDA, S; SHIMADA, M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. **Theriogenology**, v. 71, p. 491-498, 2009.

OLIVEIRA, R. R. Utilização do ácido fólico como antioxidante natural em produtos cárneos. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2012.

ORZOLEK, A.; WYSOCKI, P.; STRZEZEK, J.; KORDAN, W. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16 °C) in different extenders. **Reproductive Biology**. v. 13, p. 34-40, 2013.

PACHECO, G.D.; SILVA, C. A. da; PINTON, P.; OSWALD, I.P. ; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Phytic acid protect porcine intestinal epithelial cells from deoxynivalenol cytotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, p. 345-347, 2012.

PAP, E. H.; DRUMMEN, G. P.; WINTER, V. J.; KOOIJ, T. W.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W.; OP DEN KAMP, J. A.; HAGE, W. J.; POST, J. Á. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). **FEBS Letters**, v. 453, p. 278-282, 1999.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. **Zygote**, v. 12, p. 117-124, 2004.

PEÑA, F.J.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA, F.C.; GONZALEZ, F. L.; MACIAS, G. B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 345-349, 2009.

- PENÃ, F.J.; SARAVIA, F.; GARCIA HERREROS, M.; NUNEZ-MARTINEZ, I.; TAPIA, J.A.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 716–723, 2005.
- PETZ, B.; BALI PAPP, A.; SOMFAI, T.; NANASSY, L.; PECSI, T.; INVANCSICS, J. Effect of percoll or short time centrifugation treatment on viability and acrosome integrity of frozen/thawed boar spermatozoa. [abstract]. **Theriogenology**, v. 57, p. 681, 2002.
- RABOY, V. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1033-1043, 2003.
- RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of removing seminal plasma using a Sperm Filter on the viability of refrigerated stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.40–3, 2013.
- RHOADES, R.; PFLANZER, R. Human Physiology, 3rd. Harcourt Brace and company, Orlando, 1996.
- RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; HENNING, H.; WABERSKI, D. Quality control of boar sperm processing: implications from European AI centres and two spermatology reference laboratories. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. 2, p. 1–4, 2015.
- SALAMON, S. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Australian Journal of Biological Science**, v. 26, p. 239–247, 1973.
- SAMOUILIDIS, S.; SAOULIDIS, K.; KURIAKIS, S.; GIANNAKOPOULOS, K.; TSKALOF, P.; KYRIAKIS, S. New modified method for extending and freezing boar semen. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 47, p. 275–279, 1996.
- SARAVIA, F., WALLGREN, M., JOHANNISSON, A., CALVETE, J.J., SANZ, L., PEÑA, F.J., ROCA, J., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. **Theriogenology** v. 71, n. 662-675, 2009.
- SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; ULUTAS, P. A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134-138, 2009.
- SCHÄFER, J.; WABERSKI, D.; JUNG, M.; SCHULZE, M. Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 109-115, 2017.
- SCHRADER, R.; TREU, H.; HAHN, R. Deep freezing of boar semen in plastic straws. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 84, p. 9–12, 1977.
- SHAN, H.; XIAO-GANG, Z.; CONG, H.; SHUAI-YI, W.; DONG-QI, W.; REN-RANG, D.; JIAN-HONG, H. Effects of Three Different Diluents on Quality of Boar Semen Stored at 17°C. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 22, p. 36-46, 2015.

- SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 50, supl. 3, p. 20-26, 2015.
- SILVA, E. O.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 6, p.1357-1362, 2016.
- SILVA, C.G.; CUNHA, E.R.; BLUME, G.R.; MALAQUIAS, J.V.; BÁO, S.N.; MARTINS, C.F. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. **Cryobiology**, v. 70, p. 90–94, 2015.
- SILVA, E.O.; GEREZ, J.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Effect of phytic acid from rice and corn on morphology, cell proliferation, apoptosis and cyclooxygenase- 2 expression in swine jejunal explants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, p. 278– 285, 2014.
- STODOLAK, B.; STARZYŃSKA, A.; CZYSZCZON´, M.; Z´YŁA, K. The effect of phytic acid on antioxidant stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1041-1045, 2007.
- SURAI, P. F.; FISININ, V. I. Selenium in pig nutrition and reproduction: boars and semen quality--a review. **Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, p. 730, 2015.
- TAYLOR, C.T. Antioxidants and reactive oxygens species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 189-198, 2001.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service, 10 April, 2018. Disponível em [https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf). Acesso em: 16 jun. 2018.
- VADNAIS, M. L.; ALTHOUSE, C.G. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 1508- 1516, 2011.
- VALLORANI, C.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 58–65, 2010.
- VASCONCELOS, A. M. M. A.; MORAES, G. V. de; MOREIRA, I.; RIGOLON, L. P.; MARTINS, E. N. Características Espermáticas de Sêmen Resfriado de Suíno e Conservado em Diferentes Diluentes. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 394-401, 2001.
- VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J., NOUE, P.; COTTRON, S.; TELLIER, A. L.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 201-218, 2001.
- WAITE, J. A.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; TEAGUE, S. R.; SALAZAR JR, J. L.; MANCILL, S. S.; VARNER, D. D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, New York, v. 70, p. 704-714, 2008.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-92, 2000.

- WENTZ, I.; VARGAS A J.; BORTOLOZZO F.P.; CASTAGNA C.D. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego da inseminação artificial. Anais do III Simpósio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos, p.5-12, 2000.
- WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **PIGS - Misset**, v. 8, p. 22-23, 1992.
- YESTE, M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 71-79, 2015.
- ZAJA, I. Z.; SAMARDZIJA, M.; VINCE, S.; MAJIC-BALIĆ, I.; VILIC, M.; DJURIČIĆ, D.; MILINKOVIĆ-TUR, S. Influence of boar breeds or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical variables. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 169-176, 2016.
- ZHANG, W.; YI, K.; CHEN, C.; HOU, X.; ZHOU, X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 123-128, 2012.

### **3 HIPÓTESES**

A utilização do Sperm Filter<sup>®</sup> para a separação do plasma seminal ocasiona menores lesões de membrana nos espermatozoides de suínos quando comparada com a técnica da centrifugação.

A ação do antioxidante ácido fólico no meio diluente BTS mantém a viabilidade espermática por até 96 horas de refrigeração a 17°C.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do Sperm Filter<sup>®</sup> na separação do plasma seminal de suínos, assim como o efeito sobre as células espermáticas refrigeradas a 17°C por até 96 horas da adição de ácido fítico ao diluente de sêmen de suíno BTS.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1° Avaliar a aplicabilidade do filtro de sêmen, Sperm Filter<sup>®</sup>, na separação do plasma seminal dos espermatozoides no ejaculado de suínos.

2° Avaliar o efeito da adição de ácido fítico ao diluente de sêmen de suíno BTS sobre a cinética espermática das amostras refrigeradas a 17°C por até 96 horas.

3° Avaliar o efeito da adição de ácido fítico ao diluente de sêmen de suíno BTS sobre a morfologia espermática e integridade de membrana das amostras refrigeradas a 17°C por até 96 horas.

## 5 ARTIGO I

### USO DO SPERM FILTER® PARA SEPARAÇÃO DO PLASMA SEMINAL EM SUÍNOS

#### USE OF SPERM FILTER® FOR SEPARATION OF SEMINAL PLASMA IN SWINE

#### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi realizar a separação do plasma seminal pela filtração do ejaculado a fresco e avaliar a viabilidade das células espermáticas de suíno refrigeradas por até 96 horas. Foram utilizados oito cachacos adultos, das raças Landrace, Pietrain, Large White, Duroce Cruzado com idade média de 2 anos. A colheita do ejaculado foi realizada por meio da técnica da mão enluvada e uma amostra de 30 a 50 mL foi diluída em BTS, na proporção de 1:1. As amostras divididas em três partes iguais: BTS puro com sêmen total (BTS TOTAL), centrifugado a 600g por 10 minutos (BTS CEN) e filtrado usando o Sperm Filter® (BTS FIL). A concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL foi mantida nos grupos. A avaliação das características dos espermatozoides foi realizada em cinco tempos: a fresco (D0), após 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4) de refrigeração à 17°C. A cinética espermática foi avaliada pela análise computadorizada (sistema CASA), morfologia espermática e integridade de membrana pela coloração eosina/nigrosina e a avaliação da peroxidação lipídica pela técnica de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estatística foi realizada pela análise de variância e aplicado o teste de Tukey, nos dados normais e homogêneos e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado quando os pressupostos não foram obtidos. Para a comparação entre os tempos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para amostras pareadas. Os resultados demonstraram que o grupo BTS TOTAL obteve melhores valores para os seguintes parâmetros cinéticos: motilidade total no D0, D1, D2 e D4; motilidade progressiva no D0, D1, D2 e D4; células rápidas no D0, D1 e D2; VSL e LIN somente em D1. Para os aspectos morfológicos e integridade de membrana não foi constatada nenhuma diferença entre grupos. E no aspecto tempo, as variáveis cinéticas apresentaram melhores resultados no D0. Além disso, o TBARS demonstrou maiores níveis de lipoperoxidação para o grupo TOTAL em D0, D2, D3 e D4. O estudo concluiu que a separação do plasma seminal se faz necessária, e a técnica de filtração do sêmen de suíno com o SpermFilter® mostrou-se como uma alternativa eficiente para a remoção do plasma seminal, especialmente no sêmen suíno a fresco.

**Palavras-chave:** Cachaco. Espermatozoide. Filtro. BTS. Plasma Seminal.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to separate the seminal plasma by filtration of the fresh ejaculate and to evaluate the viability of the refrigerated porcine sperm cells for up to 96 hours. Eight boars of the Landrace, Pietrain, Large White and Duroce races with an average age of 2 years were used. The ejaculate was harvested by the gloved hand technique and a 30 to 50 mL sample was diluted in BTS at the ratio of 1: 1. The samples were divided into three parts: pure BTS with total semen (BTS TOTAL), centrifuged at 600g for 10 minutes (BTS CEN) and filtered using Sperm Filter® (BTS FIL). The final concentration of  $50 \times 10^6$  spermatozoa / ml was maintained in the groups. The sperm characteristics were evaluated in five times: fresh (D0) after 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) and 96h (D4) refrigeration at 17°C. Sperm kinetics were evaluated by computerized analysis (CASA system), sperm morphology and membrane integrity by eosin / nigrosine staining and evaluation of lipid peroxidation by the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) technique. Statistical analysis was performed by the analysis of variance and the Tukey test was used in the normal and homogeneous data and the Kruskal-Wallis test was used when the assumptions were not obtained. The Kruskal-Wallis test for paired samples was used to compare the times. The results showed that the BTS TOTAL group obtained better values for the following kinetic parameters: total motility in D0, D1, D2 and D4; progressive motility on D0, D1, D2 and D4; fast cells in D0, D1 and D2; mean velocity cells in D2; slow cells in D3 and D4; VSL and LIN only in D1. In addition, the percentage of static cells was lower in the TOTAL BTS group in all periods (D0 to D4). For morphological aspects and membrane integrity no differences between groups were reported. And in the time aspect, the kinetic variables presented better results in the D0. In addition, TBARS demonstrated higher levels of lipoperoxidation for the TOTAL group in D0, D2, D3 and D4. The study concluded that separation of seminal plasma is necessary, and the filtration technique of boar semen with SpermFilter® has proved to be an efficient alternative for the removal of seminal plasma, especially in boar fresh semen.

**Keywords:** Boar. Sperm. Filter. BTS. Seminal Plasma.

## Introdução

O plasma seminal apresenta a importante função de auxiliar o transporte dos espermatozoides pelo trato genital feminino, permitindo condições viáveis para a fertilização, assim como fornecer substratos metabólicos para as células espermáticas e participar do processo de maturação (ALKMIN et al., 2014; LI et al., 2018). Um dos desafios encontrados na suinocultura é potencializar a reprodução e produção dos suínos, buscando reduzir o volume da dose e o número de espermatozoides por dose inseminante (YESTE, 2015). O ejaculado de suíno possui um grande volume de plasma seminal, sendo que sua remoção é essencial para ajustar a concentração espermática (GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Além disso, tem sido demonstrado o efeito deletério do plasma seminal, quando em contato com as células espermáticas por um longo período de tempo, principalmente, durante o processo de criopreservação (SARAVIA et al., 2009; ALKMIN et al., 2014; BARRANCO et al., 2015). Em estudos realizados por Okazaki et al.(2009) e Li et al. (2018), a presença de plasma seminal em sêmen de suínos durante o processo de refrigeração se mostrou prejudicial para células, porém, a adição do mesmo no momento da descongelação se mostrou essencial para a viabilidade dos espermatozoides.

Atualmente, na espécie equina a centrifugação é um método convencional para a retirada do plasma seminal, pois se mostra relativamente eficaz e simples para recuperar espermatozoides. No entanto, o processo também causa danos consideráveis às células, sendo os mais comuns a lesão de membrana e acrossomo, e a hiperatividade espermática precoce, devido a força excêntrica gerada (HALLAP et al., 2004; GADEA et al., 2005; RAMIRES NETO et al., 2013).

Métodos alternativos de separação do plasma, como a filtração, têm sido estudados, a fim de minimizar as lesões nos espermatozoides e para colaborar com o aumento da viabilidade do sêmen que precisa passar pelo processo de refrigeração. Assim, a técnica de filtrar o ejaculado tem sido utilizada em várias espécies, principalmente em equinos (ALVARENGA et al., 2010; RAMIRES NETO et al., 2013; LARENTIS et al., 2018), devido ao número de animais envolvidos em diversas áreas de trabalho, como provas esportivas, policiamento e tração, e a preparação desses ejaculados demandam maior atenção devido as características espermáticas e zootécnicas desses animais, se mostrando uma opção viável para amostras que apresentem baixa qualidade espermática para equinos (ALVARENGA et al., 2010; RAMIRES NETO et al., 2013; LARENTIS et al., 2018), e demais espécies como

bovinos (CAMPANHOLI et al., 2016) e bubalinos (ALBUQUERQUE et al., 2017), contudo, desconhece - se estudos em suínos.

Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar a separação do plasma seminal suíno pela filtração do ejaculado a fresco e avaliar a viabilidade espermáticas submetido a refrigeração por até 96 horas.

## **Material e Métodos**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/Institucional de número 19758.2017.56.

### ***Animais***

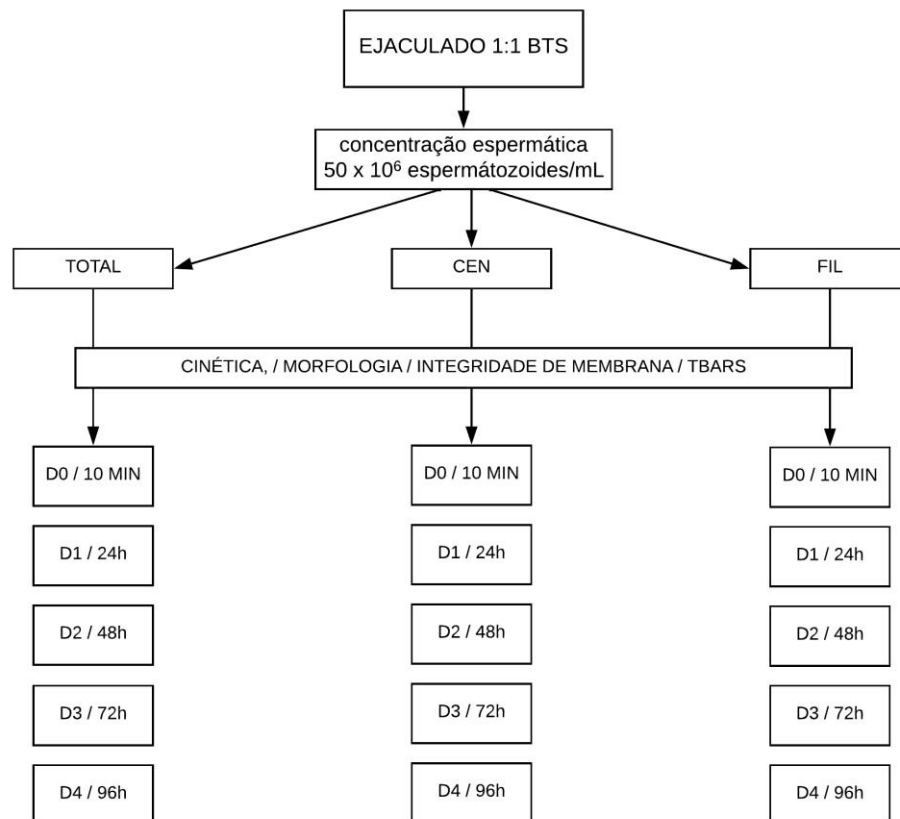
Foram obtidos ejaculados de oito (8) cachasos adultos, das raças Landrace, Pietrain, Large White, Duroc e Cruzado de fertilidade conhecida, com idade média de 24,37  $\pm$ 9,72 meses.

### ***Colheita de sêmen e divisão dos grupos***

Os ejaculados foram colhidos pela técnica da mão enluvada (HANCOCK e HOWELL,1959) com auxílio de um manequim fixo, oriundos de animais mantidos em sistema de colheita semanal. Na porção superior do recipiente de colheita, foram fixadas gazes estéreis para realizar a separação da fração gelatinosa do ejaculado, para posterior descarte. Imediatamente após a colheita, foi obtida uma alíquota de 30 a 50 mL, a qual foi diluída com o meio Beltsville Thawing Solution (BTS), (Prolimax BTSE<sup>®</sup>- formulação: cada 100g contêm: Citrato de sódio 12g; Bicarbonato de Sódio 2,5g; EDTA 2,5g; Cloreto de Potássio 1,5g; Estreptomicina 2g; Glicose Anidra qsp 100g) na proporção de 1:1. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma caixa de poliestireno para transporte até laboratório.

Cada amostra foi dividida em três partes: BTS puro com sêmen total (BTS TOTAL), centrifugado (BTS CEN) e filtrado (BTS FIL). Para as amostras BTS CEN, o sêmen foi centrifugado a 600g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em BTS. Para as amostras BTS FIL, o sêmen foi filtrado usando o Sperm Filter<sup>®</sup>(BotuPharma/Pat req. US2010/0099075, Botucatu, São Paulo, Brasil), no qual se adicionou o ejaculado dentro do filtro, que fica sobre uma placa, fez-se movimentos circulares encostando nessa placa, até restar pequeno volume dentro do filtro, finalizando a

concentração espermática, conforme as indicações do fabricante, e os espermatozoides retidos no filtro foram suspensos em BTS. A concentração final nos grupos foi de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A avaliação das características dos espermatozoides foi realizada em cinco tempos: a fresco (D0) sendo 10 minutos após a separação das alíquotas de amostra seminal em grupos, depois de 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4) de refrigeração à  $17^\circ\text{C}$ , conforme ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental. (FIL) Ejaculado Filtrado com uso do *SpermFilter*<sup>®</sup>, (CEN) Ejaculado Centrifugado a 600g por 10 min, (TOTAL) Ejaculado total. Todas as amostras foram diluídas em BTS sendo mantida a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL

### *Avaliação dos espermatozoides*

A avaliação espermática foi realizada, quanto a cinética do movimento, por meio da análise computadorizada (sistema CASA-HTR-IVOS, version 14.0), de acordo com o *setup* de suínos (Quadro 1), nos cinco momentos (D0, D1, D2, D3, D4). Foram obtidos os valores de motilidade total (% - MT); motilidade progressiva (% - MP); espermatozoides rápidos (% - Rapid); velocidade de trajeto ( $\mu\text{m/s}$  – VAP); velocidade progressiva ( $\mu\text{m/s}$  –

VSL); velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$  – VCL); amplitude lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$  – ALH); retilinearidade (% - STR) e linearidade (% - LIN).

A concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer na diluição de 1:200 com água destilada, em microscópio óptico de contraste de fase no aumento de 200x. O resultado foi expresso em número de espermatozoides/mL.

Para avaliação da morfologia e integridade de membrana espermática foram realizados esfregaços com 3  $\mu\text{L}$  das amostras espermáticas coradas com 3  $\mu\text{L}$  eosina/negrosina (BOTUVITAL®, Botufarma, Botucatu-SP) em lâminas de vidro. Foram avaliados 200 células espermáticas utilizando microscópio óptico em aumento de 1000x. As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores, divididos em defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda e acrossoma segundo CBRA (2013); e os resultados foram expressos em porcentagem. Quanto a integridade de membrana as células espermáticas foram classificadas em membrana íntegra, quando estavam translúcidas, ou lesadas, quando possuíam a cabeça com a coloração rósea. Ambas as análises foram realizadas por um único operador treinado.

#### ***Determinação de variáveis do estresse oxidativo – Tbars***

Previamente a avaliação de estresse oxidativo, todas as amostras de sêmen foram congeladas a  $-4^{\circ}\text{C}$  por um período de 30 dias.

A ocorrência da peroxidação lipídica foi avaliada por meio da técnica TBARS adaptada, descrita por Placer et al. (1966).

Em tubos Falcon foram acondicionados 2mL de solução padrão (TCA a 15%, TBA e HCl), a qual avaliava a formação de ROS espontânea da amostra; ou 2mL de solução geradora (TCA 15%, TBA, HCl,  $\text{FeCl}_2$  e BHT), a qual tinha a capacidade de induzir o máximo de peroxidação possível. Após, acrescentou-se 800 $\mu\text{L}$  de solução tampão (tris e ácido cítrico) e 200 $\mu\text{L}$  da amostra de sêmen a ser analisada.

As amostras foram submetidas a banho fervente à  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, posteriormente passaram em banho gelado à  $0^{\circ}$  por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1200 G à  $24^{\circ}\text{C}$ . Por fim, 1mL do sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro (EVOLUTION 60S, UV- visible Spectrophotometer, ThermoScientific®) com comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram expressos em Mmol de MDA/ml.

### *Análise Estatística*

Todos os parâmetros espermáticos foram comparados por análise de variância usando o programa Software Sigma Plot 11.0. Para a comparação entre os grupos BTS centrifugado, filtrado e total, das variáveis cinéticas e da técnica TBARS, foram realizados testes de normalidade e homogeneidade. Quando as amostras apresentaram-se normais e homogêneas foi utilizado análise de variância associada ao teste de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado quando os pressupostos não foram obtidos. Para a comparação entre os tempos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para amostras pareadas. Foi considerado o nível de significância de 5%.

### **Resultados**

Os resultados estão sumarizados na Tabela 1. Na cinética espermática, para D0, a porcentagem da motilidade total ( $p=0,001$ ) e de espermatozoides rápidos ( $p=0,007$ ) do grupo BTS TOTAL foram superiores aos grupos BTS CEN e BTS FIL, porém na motilidade progressiva ( $p=0,019$ ) houve diferença apenas entre os grupos BTS TOTAL e BTS CEN. Após 24h de refrigeração (D1) foram observados resultados superiores nos do grupo BTS TOTAL em relação aos grupos BTS CEN e BTS FIL para as variáveis de motilidade total ( $p=0,007$ ), progressiva ( $p=0,013$ ) e porcentagem de células rápidas ( $0,009$ ). O mesmo se repetiu, para as variáveis, VSL ( $p=0,029$ ) e LIN ( $p=0,025$ ), no qual o grupo BTS TOTAL se mostrou superior aos demais. No D2, as variáveis de motilidade total ( $p=0,004$ ) e células de velocidade rápidas ( $p=0,009$ ), se mostraram maiores no grupo BTS TOTAL em relação ao BTS CEN. Já na motilidade progressiva ( $p=0,003$ ) o BTS TOTAL foi superior aos outros grupos. No D4, apenas o BTS TOTAL apresentou resultados superiores aos outros grupos nos parâmetros de motilidade total ( $p=0,003$ ) e progressiva ( $p=0,002$ ). No fator células rápidas ( $p=0,009$ ), o grupo BTS TOTAL teve diferença apenas com relação ao grupo BTS CEN.

Para morfologia espermática e integridade de membrana não foi observado diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nem entre os tempos de armazenamento.

O tempo de refrigeração se mostrou significativo para os parâmetros de motilidade total ( $p_{TOTAL}=0,001$ ;  $p_{CEN}=0,0016$ ;  $p_{FIL}=0,001$ ), motilidade progressiva ( $p_{TOTAL}=0,001$ ;  $p_{CEN}=0,005$ ;  $p_{FIL}=0,002$ ) e células rápidas ( $p_{TOTAL}=0,001$ ;  $p_{CEN}=0,0037$ ;  $p_{FIL}=0,005$ ) para o grupo TOTAL, CEN e FIL, obtendo os melhores resultados no

D0. Já os parâmetros LIN ( $p=0,009$ ) e STR ( $p=0,002$ ) do grupo CEN demonstraram diferença significativa entre os dias bem como o STR do grupo FIL ( $p=0,003$ ).

Com a realização da técnica de TBARS, observou-se uma maior ocorrência de peroxidação lipídica para o grupo TOTAL, quando comparado ao grupo CEN e FIL. O fenômeno se repetiu nos momentos D0, D2, D3 e D4.

## **Discussão**

A amostra com sêmen total apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros quando comparada as amostras submetidas as técnicas de centrifugação e filtração. O plasma seminal possui a função de meio de transporte dos espermatozoides até o trato reprodutivo da fêmea (JUYENA; STELLETTA, 2012), porém, muitos estudos tem concentrado esforços para compreender melhor a sua ação nas células espermáticas (YESTE, 2015, 2016; LI et al., 2018), o que pode justificar os resultados encontrados neste estudo.

Na morfologia espermática e integridade de membrana não foi observado diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nem entre os tempos de armazenamento. Porém, na cinética espermática foi observado diferença significativa entre todos os grupos. A filtração se apresenta como uma forma eficiente de separar o plasma seminal das células espermáticas, uma vez que permite a passagem de 90 a 95% do plasma e retém apenas os espermatozoides, por meio de seus poros e capilares (RAMIRES NETO et al., 2013). Ela pode ser útil principalmente quando o laboratório não dispõe da centrifuga refrigerada, a qual aumenta a temperatura no momento da rotação e pode ocasionar mais danos às células espermáticas.

Alguns autores indicam a centrifugação do ejaculado de suíno em centrífuga refrigerada a  $15^{\circ}\text{C}$  (BIANCHI et al., 2008), para diminuir a possibilidade de ocorrerem lesões espermáticas, interferindo na preservação das células, contudo, no presente estudo, foi optado pelo uso da centrifuga não refrigerada para equivaler aos trabalhos que realizaram a comparação entre centrifugação e filtração com o Sperm Filter<sup>®</sup> em equinos (RAMIRES NETO et al., 2013), mesmo sendo em outra espécie.

A vantagem da filtração em relação a centrifugação seria obter melhor taxa de recuperação espermática (89% vs 81%) e semelhante cinética espermática e integridade da membrana plasmática, como obtido em amostras de sêmen de equinos refrigerado por 24 horas (ALVARENGA et al., 2012).

Os resultados da utilização do filtro podem ter sido menores do que o TOTAL devido a pequena formação de espuma durante o processamento. Autores relatam que a

formação de bolhas de ar, em contato com as células espermáticas, pode afetar a integridade proteínas da membrana por causar sua desnaturação, além de prejudicar a função mitocondrial (CLARKSON et al., 1999; SOBOLEWSKI et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016; MENEGAT et al., 2017).

Embora os estudos indiquem que o Sperm Filter<sup>®</sup> possa ser utilizado para separar o plasma seminal quando se deseja concentrar as células espermáticas ou congelar a amostra na sequência (WASILEWSKA; FRASER, 2017; LI et al., 2018), no presente estudo, para a refrigeração até 96 horas, seria mais considerável manter os espermatozoides com o plasma seminal. O estudo de proteômica do plasma seminal de suínos identificou 34 proteínas e mostrou as diferenças quantitativas entre as frações do ejaculado (PEREZ-PATIÑO et al., 2016), sendo um possível caminho para o início do entendimento mais profundo sobre esse benefício que o plasma seminal causa as células espermáticas, e a identificação de uma proteína poderá permitir maior proteção aos espermatozoides de suínos.

Os resultados deste estudo apresentaram motilidade total e progressiva equivalente a outro estudo utilizando o mesmo sistema CASA (SOUZA et al., 2013), porém com valores mais baixos comparados a outros trabalhos com sêmen de suínos, como por exemplo, Menegat et al. (2017) que refrigerou as células por 168 horas. Apesar de estes autores terem utilizado o mesmo diluente (BTS), atribuímos esse contraste nos dados pelo diferente *setup* utilizado na análise computadorizada de sêmen, a qual os valores de nota de corte do presente estudo possivelmente se encontraram mais rigorosos (Quadro 1).

Com relação aos tempos de refrigeração, o sêmen a fresco se destaca em parâmetros cinéticos, evidenciando os prejuízos sofridos pelas células espermáticas durante este processo. Wasilewska et al. (2016), ressaltam que a criopreservação submete os espermatozoides a choques térmico e osmótico, além do estresse oxidativo e das lesões de membrana. No entanto, neste estudo não foram constatadas diferenças sobre a integridade de membrana entre tempos.

Além disso, foi observado o aumento da peroxidação lipídica para o grupo TOTAL, demonstrando o estresse oxidativo gerado pela presença do plasma seminal. Os efeitos deletérios do plasma seminal sobre os espermatozoides durante a criopreservação foi descrito por Li et al., (2018a). Em contrapartida, Li et al., (2018b), indicam que o plasma seminal possuem alguns antioxidantes próprios que são úteis durante a criopreservação.

Embora os resultados obtidos no presente estudo tenham evidenciado que é importante um melhor conhecimento dos efeitos do plasma seminal sobre as células espermáticas, notou-se a necessidade da retirada do plasma seminal devido a indução do

estresse oxidativo, neste contexto a técnica de filtração do sêmen de suíno com o SpermFilter® mostrou-se como uma alternativa eficiente para a remoção do plasma seminal.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 659–668, 1995.
- ALKMIN, D.V.; PEREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. **Cryobiology**, v. 69, p. 203-210, 2014.
- ALBUQUERQUE, R. S.; MORAIS, R.; REIS, N. A.; MIRANDA, M.S.; DIAS, E.A.R.; MONTEIRO, F. M.; PAZ, C.C.P.; NICHI, M.; KAWAI, G.K.V.; DELLA ´AQUA, C.P.F.; PAPA, F.O.; VIANA, R.B.; GIMENES, L.U. Comparison of two methods of seminal plasma removal on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**. V, 52, p. 905–910, 2017.
- ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; MAGALHÃES, L.C.; PAPA, F.O. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.121; p. 186-187, 2010.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; KIEVITSBOSCH, T. ; CHAVES, M. M. B. C.; RAMIRES NETO, C. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Maryland Heights, v. 32, p. 424-429, 2012.
- BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATIÑO, C.; ALKMIN, D.V.; CERON, J.J.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility. **Andrology**, v. 3, p. 315-320. 2015.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ROSA ULGUIMA, R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, É.K.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 632-638, 2008.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte, 104 p.,2013.
- CLARKSON, J.R.; CUI, Z.F.; DARTON, R.C. Protein denaturation in foam. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 215, p. 333–338, 1999.
- GADEA, J.; MARTÍNEZ-MIRÓ, S.; DECUADRO-HANSEN, G.; MATÁS, C. 92 evaluation of boar sperm functionality after a cushioned centrifugation technique. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p. 154, 2005.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCÉ, E.; DE MERCADO, E. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation, **Animal Reproduction Science**, v. 133, p. 109–116, 2013.

- HALLAP, T.; HÅÅRD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 3-4, p. 702-713, 2004.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p. 664-665, 1959.
- JUYENA, N.S., STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p.536-551. 2012.
- LARENTIS GR, CAMOZZATO GC, BASTOS H, GREGORY RM, MATTOS RC, Equine sperm selection by synthetic membrane filter, **Journal of Equine Veterinary Science**, vol, 63, p. 69-73, 2018.
- LI, J.; ROCA, J.; PÉREZ-PATINO, C.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? **Animal Reproduction Science**, In Press, Accepted Manuscript, Available online 20 June 2018. (a)
- LI, J., BARRANCO, I., TVARIJONAVICIUTE, A., MOLINA, M. F., MARTINEZ, E. A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., ROCA, J. Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. **Theriogenology**, v. 107, p. 27-35, 2018. (b)
- MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BORTOLIN, R.C.; MENEZES, T.A.; VARGAS, A.R.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F.; BORTOLOZZO, F.P. Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 179, p. 67-79, 2017.
- RAMIRES NETO, .C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of removing seminal plasma using a Sperm Filter on the viability of refrigerated stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.40-3, 2013.
- OKAZAKI, T.; ABE, S; YOSHIDA, S; SHIMADA, M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. **Theriogenology**, v. 71, p. 491-498, 2009.
- PEREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; PARRILLA, I.; VALERO, M.L.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. **Journal of Proteomics** v.142, p.15-23, 2016.
- RIBEIRO, C.V.; MORONI, J.L.; MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. The influence of air contact on the quality of extended boar semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, p. 1423, 2016.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; PEÑA, F.J.; ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. **Theriogenology** v. 71, n. 662-675, 2009.

SOBOLEWSKI, P.; KANDEL, J.; ECKMANN, D.M. Air bubble contact with endothelial cells causes a calcium-independent loss in mitochondrial membrane potential. **PloS One**, v.7e47254, 2012.

SOUZA, F.C. de; MELANDA, C.A.A.; ZANDONADI, F.; MOROTTI, F.; MARTINS, M.I.M.; SILVA, C.A.; SENEDA, M.M. Análise do movimento espermático suíno submetido a refrigeração por até 96 horas em diferentes meios de diluição. **22° Encontro Anual de Iniciação Científica (EAIC) e 3° Encontro Anual de Iniciação Tecnológica e Inovação (EAITI)**, 2013.

STRZEZEK, J.; ŁAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Animal Science Paper and Reports**. v.17, p.181–188, 1999.

WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 185, p. 161-173, 2017.

YESTE, M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 71-79, 2015.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v.85, p.47-64, 2016.

**Quadro 1** – *Setup* utilizado no HTR-IVOS 14.0 para avaliação dos espermatozoides de suínos

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Tipo de Câmara	Cell-Vu®
Temperatura da Análise (°C)	37
Campos adquiridos	30
Quadros (Hz)	60
Número de quadros	5
Contraste estático mínimo	30
Tamanho mínimo da célula (pixels)	7
Retiliniaridade (STR), limiares (%)	70
VAP cut-off ( $\mu\text{m/s}$ )	30
Mínimo progressivo VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	45
VSL cut-off ( $\mu\text{m/s}$ )	20
Intensidade da célula	125
Magnificação	1,89

Tabela 1- Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen total (Total), centrifugado a 600g/10 min (CEN) e filtrado em sperm filter® (FIL), em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4).

Variáveis Cinéticas	D0							D1						
	Total		Centrifugado		Filtrado		P	Total		Centrifugado		Filtrado		P
	média	±DP	média	±DP	média	±DP		média	±DP	média	±DP	média	±DP	
MT	67.9A	12,4	24.9B	20,5	35.3B	24,6	0,001	46.1A	23,8	15.8B	16,6	18.5B	15,1	0,007
MP	31.9A	10,2	12B	13,0	17.6AB	15,8	0,019	21.6A	13,5	6.8B	7,5	8.1B	8,0	0,013
RAPID	51A	16,3	19.1B	17,3	26.6B	21,9	0,007	38A	21,1	12.6B	13,4	15.1B	12,6	0,009
VAP	69.8A	16,4	70A	20,9	71.5A	19,3	0,954	80.1A	13,2	46.4A	39,2	66.8A	30,5	0,097
VSL	50.6A	8,2	46.7A	8,8	52.4A	15,4	0,779	54.8A	10,4	27.6B	24,7	44.8AB	18,9	0,029
VCL	136.6A	29,3	149.1A	40,8	148.9A	33,5	0,691	161.4A	28,8	90.6A	86,3	137.9A	61,9	0,305
ALH	6.1A	0,8	6.1A	1,1	6.8A	1,3	0,390	6.7A	1,2	4.2A	4,1	6.1A	2,8	0,673
STR	75A	5,6	71.4A	10,0	74.8A	4,0	0,523	69.8A	4,5	35.6A	34,3	60.6A	25,7	0,092
LIN	39.6A	3,1	35.1A	8,3	36.9A	3,6	0,284	35.6A	2,7	17.3B	16,0	29.9B	12,5	0,025
	D2							D3						
	Total		Centrifugado		Filtrado		P	Total		Centrifugado		Filtrado		P
	média	±DP	média	±DP	média	±DP		média	±DP	média	±DP	média	±DP	
MT	36.6A	18,1	8.4Bb	10,0	17.9ABb	15,7	0,004	30.5Abc	26,1	11.1Aab	18,1	15.4Ab	15,0	0,196
MP	13.9A	6,7	3.1B	4,2	6.4B	5,7	0,003	10.9A	9,7	4A	8,2	5.4A	6,1	0,336
RAPID	28.9A	17,2	6.2B	7,7	14.6AB	13,0	0,009	24.5A	22,2	8.3A	14,5	11.8A	11,7	0,208
VAP	69.1A	13,8	45.7A	30,0	63.2A	27,5	0,146	67.4A	21,0	44.5A	37,4	66.2A	29,8	0,441
VSL	47.5A	6,5	31.7A	20,3	41.8A	17,7	0,163	44.7A	11,2	28.5A	24,1	41.8A	18,7	0,145
VCL	141.4A	28,0	100.2A	71,4	135.3A	58,9	0,464	140.7A	43,2	92.9A	78,0	136.6A	60,3	0,381
ALH	7.5A	1,8	4.7A	3,9	6.4A	2,7	0,191	7.0A	3,0	4.4A	3,9	6.2A	2,7	0,225
STR	66.7A	15,3	53.3A	34,7	59A	24,2	0,390	67.9A	5,2	42.3A	35,2	57.6A	23,7	0,269
LIN	42.4A	13,7	30A	27,4	28.4A	11,8	0,068	35.5A	6,9	22.3A	19,1	30A	12,9	0,167
	D4													
	Total		Centrifugado		Filtrado		P							
	média	±DP	média	±DP	média	±DP								
MT	26.1A	13,6	6.4B	8,7	9.1B	8,9	0,003							
MP	9.6A	5,5	2.1B	3,0	2.5B	3,2	0,002							
RAPID	20A	12,7	5.1B	7,1	6.1AB	6,2	0,009							
VAP	68.8A	10,4	43.1A	38,3	59.6A	28,4	0,707							
VSL	47.2A	5,5	28.7A	25,7	36.5A	16,5	0,294							
VCL	141.2A	23,6	98.1A	82,8	135.1A	72,1	0,053							
ALH	7.2A	1,1	3.5A	3,8	6.4A	2,7	0,160							
STR	70.1A	5,2	42.3A	35,2	57.3A	24,5	0,167							
LIN	36.8A	6,6	19.5A	17,5	28.9A	13,6	0,413							

\*MT: motilidade total (%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio(µm/s), VSL: velocidade progressiva(µm/s), VCL: velocidade curvilínea (µm/s), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça (µm), STR: retilinearidade (%), LIN: linearidade (%). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos sêmen total (Total), centrifugado a 600g/10 min (CEN) e filtrado em sperm filter® (FIL).

Tabela 2 - Média dos resultados da análise morfológica e avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) de amostras de sêmen total (Total), centrifugado a 600g/10 min (CEN) e filtrado em sperm filter® (FIL) em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Cinéticas	D0							D1						
	Total		Centrifugado		Filtrado		P	Total		Centrifugado		Filtrado		P
	média	±DP	média	±DP	média	±DP		média	±DP	média	±DP	média	±DP	
*DEF Maior %	9.1A	4,9	8.3A	5,6	9.2A	4,3	0,915	10.1A	8,4	9.3A	5,9	10.6A	6,4	0,920
**DEF Menor %	11.6A	12,8	10.5A	7,4	10.1A	10,2	0,857	10A	8,0	9.6A	7,2	10.4A	10,0	0,973
***DEF totais %	20.7A	15,5	18.8A	10,7	19.3A	13,1	0,965	20.1A	15,1	18.9A	10,7	21.1A	14,2	0,955
Integridade Membrana	10.7A	6,0	14.6A	10,0	13.9A	4,5	0,327	8.2A	4,1	14.6A	13,8	10.9A	3,2	0,273
TBA SP mmol/ml	8.1A	5,2	3.9B	2,1	2.9B	0,9	0,011	8.6A	7,2	4.9A	4,0	4.1A	3,5	0,202
TBA SG mmol/ml	5.6A	2,4	3.7AB	1,3	3.1B	1,3	0,029	7.1A	4,7	4.4A	2,5	4.6A	2,0	0,267
	D2							D3						
	Total		Centrifugado		Filtrado		P	Total		Centrifugado		Filtrado		P
	média	±DP	média	±DP	média	±DP		média	±DP	média	±DP	média	±DP	
*DEF Maior %	16.4A	17,4	13.3A	14,4	16.6A	15,6	0,726	10.2A	8,6	10.4A	6,5	10.7A	6,7	0,888
**DEF Menor %	9.6A	10,4	7.3A	7,8	10.4A	9,0	0,686	8.8A	7,4	7.9A	6,5	8.8A	8,8	0,970
***DEF totais %	26A	22,3	20.6A	18,9	27A	22,9	0,635	19A	15,1	18.3A	11,9	19.5A	14,6	0,913
Integridade Membrana	9.3A	2,9	16.4A	16,9	16.9A	10,3	0,064	11.6A	3,4	20.9A	27,0	17.3A	13,2	0,629
TBA SP mmol/ml	7.4A	4,2	2.4B	1,6	2.7AB	0,9	0,024	10.25A	6,1	2.3B	1,8	4.3AB	2,5	0,005
TBA SG mmol/ml	7.5A	4,1	3.7B	1,8	4.2AB	2,1	0,030	7.88A	4,0	3.7B	1,3	6.2AB	3,9	0,030
	D4													
	Total		Centrifugado		Filtrado		P							
	média	±DP	média	±DP	média	±DP								
*DEF Maior %	10.6A	7,3	8.8A	6,1	11.6A	9,5	0,768							
**DEF Menor %	8.6A	7,0	9.1A	7,7	10.1A	8,7	0,970							
***DEF totais %	19.1A	12,8	17.9A	12,6	21.8A	17,0	0,920							
Integridade Membrana	11.8A	4,5	22.8A	31,3	23.4A	25,2	0,348							
TBA SP mmol/ml	6.4A	4,0	1.7B	1,1	3.8AB	2,9	0,008							
TBA SG mmol/ml	7.6A	3,4	5A	2,9	4.9A	3,9	0,103							

\* DEF maior – defeitos maiores, DEF menor – defeitos menores, DEF totais – defeitos morfológicos totais; todos os resultados apresentados estão expressos em %. TBARS SP-  $\mu\text{mol}$  de MDA/ml TBARS SG-  $\mu\text{mol}$  de MDA/ml. Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos sêmen total (Total), centrifugado a 600g/10 min (CEN) e filtrado em sperm filter® (FIL)

Tabela 3- Média dos resultados da análise cinética de amostras de sêmen suíno total (TOTAL) em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

TOTAL Variáveis	D0		D1		D2		D3		D4		valor p
	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	
MT	67.9a	12,4	46.1b	23,8	36.6bc	18,1	30.5bc	26,1	26.1c	13,6	0.001
MP	31.9a	10,2	21.6ab	13,5	13.9ab	6,7	10.9b	9,7	9.6b	5,5	0.001
RAPID	51 <sup>a</sup>	16,3	38ab	21,1	28.9b	17,2	24.5b	22,2	20b	12,7	0.001
VAP	69.8a	16,4	80.1a	13,2	69.1a	13,8	67.4a	21,0	68.8a	10,4	0,299
VSL	50.6a	8,2	54.8a	10,4	47.5a	6,5	44.7a	11,2	47.2a	5,5	0,075
VCL	136.6a	29,3	161.4a	28,8	141.4a	28,0	140.7a	43,2	141.2a	23,6	0,383
ALH	6.1a	0,8	6.7a	1,2	7.5a	1,8	7.0a	3,0	7.2a	1,1	0,443
STR	75a	5,6	69.8a	4,5	66.7a	15,3	67.9a	5,2	70.1a	5,2	0,118
LIN	39.6a	3,1	35.6a	2,7	42.4a	13,7	35.5a	6,9	36.8a	6,6	0,203

\*MT: motilidade total(%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidade progressiva( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ ), STR: retilinearidade (%), LIN: linearidade (%). Letras minúsculas demonstram diferença entre os tempos.

Tabela 4- Média dos resultados da análise morfológica e avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) de amostras de sêmen suíno total (TOTAL), refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

TOTAL MORFOLOGIA / TBARS	D0		D1		D2		D3		D4		valor p
	Média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	
*DEF Maior %	9.1a	4,9	10.1a	8,4	16.4a	17,4	10.2a	8,6	10.6a	7,3	0,768
**DEF Menor %	11.6a	12,8	10a	8,0	9.6a	10,4	8.8a	7,4	8.6a	7,0	0,479
***DEF totais %	20.7a	15,5	20.1a	15,1	26a	22,3	19a	15,1	19.1a	12,8	0,948
IM	10.7a	6,0	8.2a	4,1	9.3a	2,9	11.6a	3,4	11.8a	4,5	0,062
TBA SP mmol/ml	8.1a	5,2	8.6a	7,2	7.4a	4,2	10.25a	6,1	6.4a	4,0	0,476
TBA SG mmol/ml	5.6a	2,4	7.1a	4,7	7.5a	4,1	7.88a	4,0	7.6a	3,4	0,479

\* DEF maior – defeitos maiores, \*\*DEF menor – defeitos menores, \*\*\*DEF totais – defeitos morfológicos totais; todos os resultados apresentados estão expressos em %. TBARS SP-  $\mu\text{mol}$  de MDA/ml- reação espontânea; TBARS SG-  $\mu\text{mol}$  de MDA/ml- reação induzida. Letras minúsculas demonstram diferença entre os tempos de refrigeração (D0, D1, D2, D3, D4).

Tabela 5- Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen centrifugado (CEN) a 600g/10 min em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4).

CEN	D0		D1		D2		D3		D4		valor p
	Variáveis	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	
MT	24.9a	20,5	15.8ab	16,6	8.4b	10,0	11.1ab	18,1	6.4b	8,7	0,016
MP	12a	13,0	6.8a	7,5	3.1a	4,2	4a	8,2	2.1a	3,0	0,050
RAPID	19.1a	17,3	12.6ab	13,4	6.2ab	7,7	8.3ab	14,5	5.1b	7,1	0,037
VAP	70a	20,9	46.4a	39,2	45.7a	30,0	44.5a	37,4	43.1a	38,3	0,671
VSL	46.7a	8,8	27.6a	24,7	31.7a	20,3	28.5a	24,1	28.7a	25,7	0,051
VCL	149.1a	40,8	90.6a	86,3	100.2a	71,4	92.9a	78,0	98.1a	82,8	0,736
ALH	6.1a	1,1	4.2a	4,1	4.7a	3,9	4.4a	3,9	3.5a	3,8	0,247
STR	71.4a	10,0	35.6b	34,3	53.3b	34,7	42.3ab	35,2	42.3b	35,2	0,002
LIN	35.1a	8,3	17.3b	16,0	30ab	27,4	22.3ab	19,1	19.5ab	17,5	0,009

\*MT: motilidade total (%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidade progressiva( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ ), STR: retilinearidade (%), LIN: linearidade (%). Letras minúsculas demonstram diferença entre os tempos.

Tabela 6- Média dos resultados da análise morfológica de amostras de sêmen suíno centrifugado a 600g/10 min (CEN) em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

CEN MORFOLOGIA	D0		D1		D2		D3		D4		valor p
	/ TBARS	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	
*DEF Maior %	8.3a	5,6	9.3a	5,9	13.3a	14,4	10.4a	6,5	8.8a	6,1	0,281
**DEF Menor %	10.5a	7,4	9.6a	7,2	7.3a	7,8	7.9a	6,5	9.1a	7,7	0,145
***DEF totais %	18.8a	10,7	18.9a	10,7	20.6a	18,9	18.3a	11,9	17.9a	12,6	0,653
IM	14.6a	10,0	14.6a	13,8	16.4a	16,9	20.9a	27,0	22.8a	31,3	0,578
TBA SP mmol/ml	3.9ab	2,1	4.9a	4,0	2.4ab	1,6	2.3ab	1,8	1.7b	1,1	0,032
TBA SG mmol/ml	3.7a	1,3	4.4a	2,5	3.7a	1,8	3.7a	1,3	5a	2,9	0,125

\* DEF maior – defeitos maiores, \*\*DEF menor – defeitos menores, \*\*\*DEF totais – defeitos morfológicos totais; todos os resultados apresentados estão expressos em %. TBARS SP-  $\mu\text{mol}$  de MDA/ml- reação espontânea; TBARS SG-  $\mu\text{mol}$  de MDA/ml- reação induzida. Letras minúsculas demonstram diferença entre os tempos de refrigeração (D0, D1, D2, D3, D4).

Tabela 7- Média dos resultados da avaliação cinética no sistema CASA de ejaculado de suíno sendo amostras de sêmen filtrado em sperm filter® (FIL), em cinco momentos: a fresco (D0), refrigerado a 17 °C por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4).

FIL	D0		D1		D2		D3		D4		valor p
	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	
<b>MT</b>	35.3a	24,6	18.5b	15,1	17.9b	15,7	15.4b	15,0	9.1b	8,9	0,001
<b>MP</b>	17.6a	15,8	8.1ab	8,0	6.4ab	5,7	5.4ab	6,1	2.5b	3,2	0,002
<b>RAPID</b>	26.6a	21,9	15.1ab	12,6	14.6ab	13,0	11.8b	11,7	6.1b	6,2	0,005
<b>VAP</b>	71.5a	19,3	66.8a	30,5	63.2a	27,5	66.2a	29,8	59.6a	28,4	0,516
<b>VSL</b>	52.4a	15,4	44.8a	18,9	41.8a	17,7	41.8a	18,7	36.5a	16,5	0,308
<b>VCL</b>	148.9a	33,5	137.9a	61,9	135.3a	58,9	136.6a	60,3	135.1a	72,1	0,865
<b>ALH</b>	6.8a	1,3	6.1a	2,8	6.4a	2,7	6.2a	2,7	6.4a	2,7	0,986
<b>STR</b>	74.8a	4,0	60.6ab	25,7	59b	24,2	57.6b	23,7	57.3b	24,5	0,003
<b>LIN</b>	36.9a	3,6	29.9a	12,5	28.4a	11,8	30a	12,9	28.9a	13,6	0,085

\*MT: motilidade total(%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio(µm/s), VSL: velocidade progressiva(µm/s), VCL: velocidade curvilínea (µm/s), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça (µm), STR: retilinearidade (%), LIN: linearidade (%). Letras minúsculas demonstram diferença entre os tempos.

Tabela 8- Média dos resultados da análise morfológica de amostras de sêmen suíno filtrado em sperm filter® (FIL), em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

FIL MORFOLOGIA / TBARS	D0		D1		D2		D3		D4		valor p
	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	média	±DP	
<b>*DEF Maior %</b>	9.2a	4,3	10.6a	6,4	16.6a	15,6	10.7a	6,7	11.6a	9,5	0,892
<b>**DEF Menor %</b>	10.1a	10,2	10.4a	10,0	10.4a	9,0	8.8a	8,8	10.1a	8,7	0,859
<b>***DEF totais %</b>	19.3a	13,1	21.1a	14,2	27a	22,9	19.5a	14,6	21.8a	17,0	0,931
<b>IM</b>	13.9a	4,5	10.9a	3,2	16.9a	10,3	17.3a	13,2	23.4a	25,2	0,216
<b>TBA SP mmol/ml</b>	2.9a	0,9	4.1a	3,5	2.7a	0,9	4.3Aa	2,5	3.8a	2,9	0,379
<b>TBA SG mmol/ml</b>	3.1a	1,3	4.6a	2,0	4.2Aa	2,1	6.2Aa	3,9	4.9a	3,9	0,118

\*DEF maior – defeitos maiores, \*\*DEF menor – defeitos menores, \*\*\*DEF totais – defeitos morfológicos totais; todos os resultados apresentados estão expressos em %. TBARS SP- µmol de MDA/ml- reação espontânea; TBARS SG- µmol de MDA/ml- reação induzida. Letras minúsculas demonstram diferença entre os tempos de refrigeração (D0, D1, D2, D3, D4).

## 6 ARTIGO II

### EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE ÁCIDO FÍTICO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS

#### EFFECT OF THE ADDITION OF FETHIC ACID ANTIOXIDANT TO SWINE SEMI REFRIGERATION DILUENT

#### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética, morfologia e integridade de membrana nas células espermáticas refrigeradas por até 96 horas, o efeito da adição de ácido Fítico ao diluente BTS de refrigeração de sêmen de suíno. Foram utilizados oito cachacos adultos, das raças Landrace, Pietrain, Large White, Duroc e Cruzado com idade média de 2 anos. A colheita do ejaculado foi realizada por meio da técnica da mão enluvada e duas alíquotas de 30 a 50 mL foram diluídas, uma com BTS outra com BTS acrescido de ácido Fítico (AF) na concentração de 0,5 mM, na proporção de 1:1. As amostras foram divididas em seis grupos. Três grupos com BTS, sendo: puro com sêmen total (BTS TOTAL), (BTS CEN) centrifugado a 600g por 10 minutos, (BTS FIL) filtrado usando o SpermFilter®, e três grupos de BTS acrescido de AF a uma concentração de 0,5 mM, sendo: BTS com sêmen total (AF TOTAL), centrifugado (AF CEN) e filtrado (AF FIL). Cada grupo manteve uma concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A avaliação das características dos espermatozoides foi realizada em cinco tempos: a fresco (D0), após a refrigeração à 17°C por 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4). A cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA, a morfologia espermática e integridade de membrana pela coloração eosina/nigrosina, e a peroxidação lipídica pela técnica TBARS. A análise estatística foi realizada no software Sigma Plot 11.0 e utilizou-se o teste t e/ ou o teste de Mann-Whitney, considerando nível de significância de 5%. Houve diferença entre os grupos TOTAL AF e TOTAL BTS para as variáveis ALH, STR e LIN no D0. A integridade de membrana foi maior para o grupo TOTAL AF nos momentos D3 e D4. Não ocorreram diferenças para nenhuma variável entre os grupos CEN AF e CEN BTS. E entre os grupos FIL AF e FIL BTS observou-se divergência significativa somente para o parâmetro ALH. Não foi observada diferença referente a peroxidação lipídica para nenhum grupo, demonstrando que o ácido fítico na concentração de 0,5 Mm não se mostrou eficiente na redução de reações de peroxidação, no entanto, foi efetivo na proteção de membrana plasmática de espermatozoides após 72 horas de refrigeração.

**Palavras-chave:** Cachaco. Fitato. Antioxidante. Criopreservação. Espermatozoide.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the kinetics, morphology and membrane integrity of the sperm cells refrigerated for up to 96 hours, the effect of the addition of phytic acid to the BTS diluent of porcine semen refrigeration. Eight adult Landrace, Pietrain, Large White, Duroc and crossbreed boars with an average age of 2 years were used. The ejaculate was harvested using the gloved hand technique and two aliquots of 30 to 50 mL were diluted, one with BTS another with BTS plus 0.5 mM phytic acid (AF) at a concentration of 1: 1. The samples were divided into six groups. Three groups with BTS, being: pure with total semen (TOTAL BTS), (CEN BTS) centrifuged at 600g for 10 minutes, (FIL BTS) filtered using Sperm Filter®, and three BTS groups added with AF at a concentration of 0.5 mM, being: BTS with total semen (TOTAL AF), centrifuged (CEN AF) and filtered (FIL AF). Each group maintained  $50 \times 10^6$  sperm / mL as final concentration. The sperm characteristics were evaluated in five periods: fresh (D0), after cooling at 17 ° C for 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) and 96h (D4). Sperm kinetics were evaluated by the CASA system, sperm morphology and membrane integrity by eosin / nigrosin staining, and lipid peroxidation was measured by TBARS technique. The statistical analysis was made in the software Sigma Plot 11.0, the t-test and the Mann-Whitney test were used, considering a significance level of 5%. There was a difference between the TOTAL AF and TOTAL BTS groups for the variables ALH, STR and LIN in D0. Membrane integrity values was higher for the TOTAL AF group at moments D3 and D4. There were no significant differences for any variables between the CEN AF and CEN BTS groups. And significant divergence was observed only for ALH among the FIL AF and FIL BTS groups. No statistical difference regarding lipid peroxidation was observed for any group, demonstrating that 0.5 Mm of Phytic acid was not efficient to reduction peroxidation reactions, however it was effective in the spermatozoa's plasma membrane protection after 72 hours of cooling.

**Keywords:** Boar. Fitato. Antioxidant. Cryopreservation. Sperm.

## Introdução

O sêmen de suíno apresenta grande sensibilidade as técnicas de processamento do ejaculado, principalmente na criopreservação. Pelo fato de ter em sua composição alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, os espermatozoides são sensíveis ao estresse oxidativo (AWDA et al., 2009; CADAVID, 2010). A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em pequenas quantidades, desempenha papéis benéficos essenciais na capacitação espermática, na hiperativação da motilidade espermática e na reação acrossômica (AWDA et al., 2009; MENEGAT et al., 2017). Somente quando as concentrações de ROS excedem o nível de limiar que se tornam prejudiciais (RHOADES e PFLANZER, 1996; NOGUEIRA et al. 2013), causando peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas das membranas, enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS et al., 2006).

As alterações causadas podem reduzir o potencial de fertilidade, levando a danos ao DNA, perda de motilidade decorrentes de alterações na peça intermediária, reestruturação acrossomal, modificação no evento de fusão de oócitos, alterações no citoesqueleto de esperma e danos nas mitocôndrias, as quais são a principal fonte da produção de ROS, resultantes do processo respiratório (AITKEN et al., 1988; DE LAMIRANDE et al., 1997; LOPES et al., 1998; EVENSON e WIXON, 2006; PENÃ et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Também pode haver a indução de apoptose pelas altas concentrações de óxido Nítrico (NO) (MORAN et al., 2008) ou liberação de proteínas pré apoptóticas que iniciam alteração semelhante a capacitação e a morte celular (MISHRA, SHANA, 2005).

O estresse oxidativo pode ser parcialmente bloqueado com a atuação de antioxidantes, que são utilizados na tentativa de impedir a diminuição da qualidade dos espermatozoides após a criopreservação (TAYLOR, 2001; BATHGATE, 2011). O uso de antioxidantes, adicionado ao diluente, visa retardar ou prevenir a oxidação do substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989), exercendo um efeito protetor sobre a membrana plasmática, sendo capaz de manter a atividade metabólica e a viabilidade celular (BECONI et al., 1993).

O uso de antioxidantes, como o ácido Fólico, vem sendo pesquisado nas diferentes áreas da suinocultura, como por exemplo na nutrição, avaliando seus efeitos na integridade de membrana de células epiteliais intestinais de suínos (FILGUEIRAS et al., 2009), sendo evidenciado que o ácido Fólico diminuiu significativamente as alterações morfológicas induzidas por micotoxinas atuantes no jejuno de suínos. (SILVA, GEREZ, BRACARENSE, 2014).

Seu efeito antioxidante é devido à sua capacidade de inibir a formação de radicais hidroxila (OH) e deriva de sua afinidade de ligação relativamente alta para o ferro, fazendo com que eles se tornem inativos cataliticamente (GRAF, EATON, 1990; STODOLAK et al., 2007; HARBACH et al., 2007; CANAN et al., 2011), o qual pode agir inibindo condições patológicas chegando a ter ação antineoplásica (SILVA, BRACARENSE 2016).

A técnica mais utilizada para mensurar a peroxidação lipídica, resultante do estresse oxidativo, em espermatozoides de mamíferos é o método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),(AITKEN et al. 1993; BAUMBER et al. 2000). A metodologia que quantifica o estresse oxidativo pode ser feita de forma direta ou indireta. Dentre as formas de avaliação indiretas estão incluídos os testes de capacidade antioxidante total (TAC) e peroxidação lipídica, como o TBARS (AGARWAL; QIU; SHARMA, 2018).

Apesar das publicações destacarem a ação antioxidante do ácido fítico na dieta dos animais (OLIVEIRA, 2012; PACHECO et al., 2012) e na qualidade da carne (COSTA et al., 2011), não há relatos na literatura de estudos com a utilização deste antioxidante diretamente no diluente do sêmen. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar a cinética, morfologia, integridade de membrana e estresse oxidativo sobre as células espermáticas refrigeradas por até 96 horas sob efeito da adição de ácido fítico ao diluente de refrigeração de sêmen de suíno.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/Institucional de número 19758.2017.56.

Foram utilizados ejaculados de oito (8) cachasos adultos, com uma colheita de cada, sendo o grupo composto por raças variadas (Landrace, Pietrain, Large White, Duroc, Cruzado). Os animais tinham idade média de 24,37 ( $\pm$ 9,72) meses e a fertilidade era conhecida.

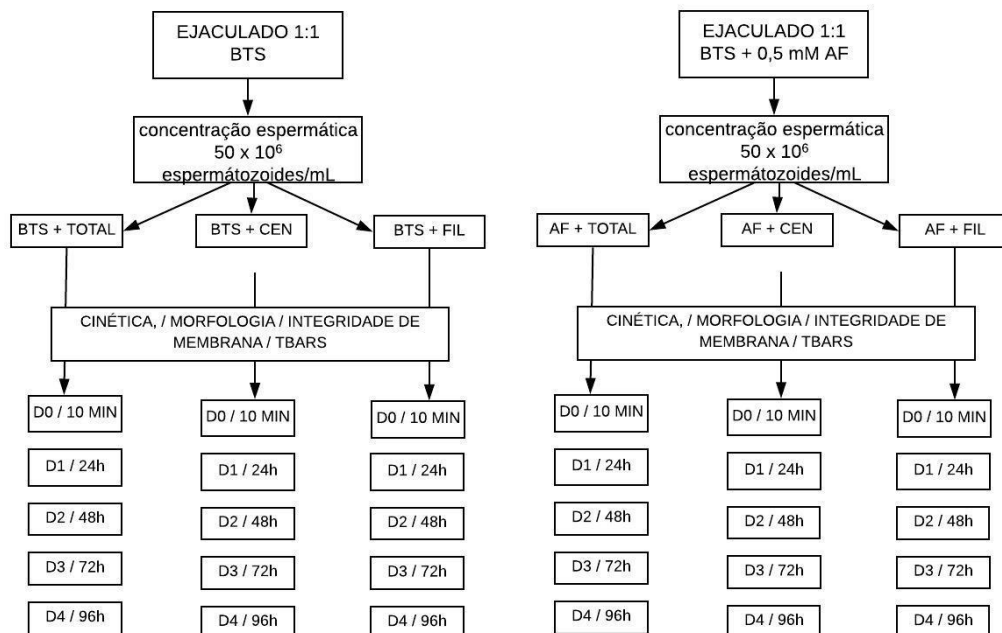
### ***Colheita de sêmen e divisão dos grupos***

Os cachasos foram mantidos em sistema de colheita semanal e a técnica utilizada foi a da mão enluvada (HANCOCK e HOWELL,1959) com auxílio de um manequim fixo. Na porção superior do recipiente de colheita, foram fixadas gazes estéreis para realizar a separação da fração gelatinosa do ejaculado, para posterior descarte. Imediatamente após a colheita, uma alíquota de 30 a 50 mL foi obtida e dividida em duas amostras, sendo a primeira amostra diluída com BeltsvilleThawingSolution (BTS) (Prolimax BTSE® - formulação: cada 100g contêm: Citrato de sódio 12g; Bicarbonato de Sódio 2,5g; EDTA 2,5g; Cloreto de Potássio 1,5g;

Estreptomicina 2g; Glicose Anidra qsp 100g), e a segunda amostra diluída em BTS acrescido de ácido fítico na concentração de 0,5 mM (AF) na proporção de 1:1. Em seguida foram acondicionadas em caixa de transporte de poliestireno e, em aproximadamente 40 minutos, as análises foram iniciadas.

O delineamento foi exemplificado na Figura 2. As amostras foram divididas em seis grupos: BTS com sêmen total (BTS TOTAL), centrifugado a 600g por 10 minutos (BTS CEN) e filtrado usando o SpermFilter® (BotuPharma/Pat req. US2010/0099075, Botucatu, São Paulo, Brasil), conforme as indicações do fabricante (BTS FIL). Os grupos acrescido com ácido Fítico a uma concentração de 0,5 mM foram: BTS com sêmen total (AF TOTAL), centrifugado (AF CEN) e filtrado (AF FIL), sendo utilizadas as mesmas técnicas de centrifugação e filtração do outro grupo.

A concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL foi padronizada em cada uma das alíquotas nos grupos. Após, as amostras alíquotadas foram refrigeradas em geladeira com temperatura controlada de 15° a 17°C, por até 96 horas. A avaliação das características dos espermatozoides foi realizada em cinco tempos: a fresco (D0), após a refrigeração à 17°C por 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4). Como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental. (FIL) Filtrado com uso do SpermFilter®, (CEN) Centrifugado a 600g por 10 min, (AF) Ácido Fítico na concentração de 0,5 mM adicionado ao meio diluente BTS. (TOTAL) Ejaculado total. Todos na concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides /mL diluídos/suspensos em BTS.

### ***Avaliações dos Espermatozoides***

As análises espermáticas foram realizadas quanto a cinética do movimento por meio da análise computadorizada (sistema CASA), concentração pela câmara de Neubauer, morfologia espermática e integridade de membrana pela coloração eosina/nigrosina (BOTUVITAL®, Botufarma, Botucatu-SP).

### ***Avaliação Espermática pela Análise Computadorizada***

As avaliações foram realizadas nos cinco momentos (D0, D1, D2, D3 e D4). Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo sistema CASA (HTR-IVOS, version 14.0), utilizando o *setup* de suínos (Quadro 1). Foram obtidos os valores de motilidade total (% - MT); motilidade progressiva (% - MP); espermatozoides rápidos (% - Rapid); velocidade de trajeto ( $\mu\text{m/s}$  - VAP); velocidade progressiva ( $\mu\text{m/s}$  - VSL); velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$  - VCL); amplitude lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$  - ALH); retilinearidade (% - STR) e linearidade (% - LIN).

### ***Concentração pela Câmara de Neubauer***

Foi utilizada a diluição 1:200 de amostra em água destilada e leitura em câmara de Neubauer, em microscópio óptico de contraste de fase no aumento de 200x. O resultado foi expresso em número de espermatozoides/mL.

### ***Morfologia espermática e Integridade de Membrana***

Para avaliação da morfologia espermática e integridade de membrana foram realizados esfregaços com 3 $\mu\text{l}$  de amostra dos espermatozoides corados com 3 $\mu\text{l}$  eosina nigrosina (BotuVital®) em lâminas de vidro. Foram avaliadas 200 células espermáticas utilizando microscópio óptico em aumento de 1000x. As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores, divididos em defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda e acrossoma, segundo CBRA (2013); e os resultados foram expressos em porcentagem. Quanto a integridade de membrana as células espermáticas foram classificadas em membrana íntegra, quando estavam translúcidas, e lesadas quando possuíam a cabeça com a coloração rósea.

Ambas as análises foram realizadas por um único operador treinado.

### ***Determinação de variáveis do estresse oxidativo – Tbars***

Previamente a avaliação de estresse oxidativo, todas as amostras de sêmen foram congeladas a  $-4^{\circ}\text{C}$  por um período de 30 dias.

A ocorrência da peroxidação lipídica foi avaliada por meio da técnica TBAR adaptada, descrita por Placer et al. (1966).

Em tubos Falcon foram acondicionados 2mL de solução padrão (TCA a 15%, TBA e HCl), a qual avaliava a formação de ROS espontânea da amostra; ou 2mL de solução geradora (TCA 15%, TBA, HCl,  $\text{FeCl}_2$  e BHT), a qual tinha a capacidade de induzir o máximo de peroxidação possível. Após, acrescentou-se 800 $\mu\text{L}$  de solução tampão (tris e ácido cítrico) e 200 $\mu\text{L}$  da amostra de sêmen a ser analisada.

As amostras foram submetidas a banho fervente a  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, posteriormente passaram em banho gelado a  $0^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1200 G a  $24^{\circ}\text{C}$ . Por fim, 1mL do sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro (EVOLUTION 60S, UV- visible Spectrophotometer, ThermoScientific<sup>®</sup>) com comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram expressos em Mmol de MDA/ml.

### ***Análise Estatística***

Para a comparação entre os grupos com ácido fítico e sem ácido fítico foi utilizado o teste t quando as amostras apresentaram-se normais e homogêneas e o teste de Mann-Whitney quando não apresentavam estes pressupostos. Embora tenha-se utilizado testes não paramétricos, os resultados foram apresentados nas tabelas em forma de média e desvio padrão para melhor visualização. Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5% e software SigmaPlot 11.0.

### **Resultados**

A partir dos resultados expressos na Tabela 1, notou-se que os dados de ALH (5,4 *versus* 6,1-  $p < 0,050$ ), STR (79,9 *versus* 75,0 –  $p = 0,048$ ) e LIN (46,0 *versus* 39,6 –  $p = 0,003$ ) em sêmen TOTAL a fresco (D0) apresentaram diferença, demonstrando melhor característica de movimento no grupo AF, no qual a trajetória das células espermáticas se mostraram com maior retilinearidade e linearidade. Após 24 horas da refrigeração (D1, D2, D3 e D4), houve equivalência entre os dois grupos (BTS e AF).

Os resultados de morfologia espermática da amostra de sêmen TOTAL (Tabela 2) se mostrou constante nos dois grupos; entretanto a integridade de membrana após 72 horas

(D3 = 7,3 *versus* 11,6 – p= 0,029) e 96 horas (D4 = 7,4 *versus* 11,8 – p=0,024,) de refrigeração foram superiores no grupo AF comparado ao BTS.

Na amostra centrifugada (CEN), os resultados da cinética espermática e morfologia espermática se mantiveram semelhantes entre os grupos BTS e AF, tanto na análise a fresco (D0) quanto nos momentos de refrigeração (D1 a D4), (Tabelas 3 e 4) não havendo diferença entre os dois grupos.

Para os espermatozoides que passaram pelo processo de filtração (FIL) no D0, a variável ALH mostrou melhores resultados no grupo AF (5,5 $\mu$ m) quando comparado ao BTS (6,8  $\mu$ m), (p= 0,033), porém com o passar das horas de refrigeração (D1, D2, D3 e D4), se mostraram constantes tanto na cinética, quanto na morfologia espermática (Tabelas 5 e 6). A partir dos resultados da avaliação da peroxidação lipídica através do TBARS, não se constatou diferença estatística entre os grupos AF e BTS, tanto para sêmen TOTAL, CEN ou FIL (Tabelas 2, 4 e 6).

## **Discussão**

Na literatura, já é conhecido que, a refrigeração do sêmen de suíno pode ocasionar danos às células espermáticas pela produção espontânea de ROS, e embora os espermatozoides contenham enzimas antioxidantes intracelulares, muitas vezes não é o suficiente para conter os subprodutos excessivos gerados pelo metabolismo de oxigênio. Esse desequilíbrio pode iniciar reações oxidativas levando a perda da função espermática (MARMUNTI et al., 2012; MARTÍNEZ-SOTO et al., 2013).

A adição de antioxidantes em meios diluentes, com a intenção de diminuir as reações de peroxidação lipídica e danos aos espermatozoides, tem sido debatido nos últimos anos, em inúmeras espécies, como cães (LUCIO et al., 2016), equinos (NOGUEIRA et al., 2015), bovino (KAKA et al., 2017) e em suínos (PIPAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

A técnica TBARS para avaliar a ação de antioxidantes também foi utilizada na espécie suína por Pipan e colaboradores (2017), os quais notaram uma redução no estresse oxidativo ao retirar proteínas de baixo peso molecular e acrescentar  $\alpha$ -tocoferol ao sêmen suíno. Já a adição de ácido clorogênico ao diluente de refrigeração para sêmen suíno se mostrou eficiente após 72 horas de refrigeração, ao diminuir os níveis de MDA produzidos (PEREIRA et al., 2018). No entanto, o mesmo não ocorreu no presente estudo, pois constatou-se que na concentração de 0,5 mM de ácido fítico, definido previamente por meio de experimentos elaborados pelo mesmo grupo de pesquisa, não apresentou função antioxidante

quando comparada ao grupo BTS, na análise de peroxidação lipídica TBARS. Um efeito semelhante foi observado por Zhang et al., (2017), que suplementaram o diluente com Superóxido dismutase (SOD) em diferentes concentrações (0, 100, 200, 300 e 400 U/ml) e só obtiveram redução nos níveis de MDA com a concentração de 200 U/ml de SOD.

A ação do ácido fítico ocorre por meio da inibição de reações oxidativas por ser um quelante de ferro provocando a redução da peroxidação lipídica. Podendo exercer sua função antioxidante de três formas: primeiro, como quelante, pode ocluir todas as posições de coordenação reativa, tornando o ferro inerte cataliticamente. Em segundo lugar, pode reforçar um estado de oxidação exclusivo, bloqueando os ciclos de redução do metal pois muitas reações mediadas por ferro exigem esse estado de oxidação. Em terceiro, certas reações de ferro podem exigir a justaposição direta do metal reativo com o substrato, e o ácido fítico pode retardar estas reações impedindo a ligação do ferro à molécula hospedeira (GRAF; EATON, 1990). Sendo assim, a ausência de diferença entre a peroxidação lipídica dos grupos BTS e AF, pode ser explicado pelo fato de que o ácido fítico na concentração de 0,5Mm tenha sido baixa, e rapidamente consumida pelas células espermáticas, não havendo ação antioxidante por um período prolongado.

Este estudo é o primeiro a avaliar a adição do antioxidante ácido fítico ao sêmen de suínos e seu efeito durante um tempo prolongado de refrigeração. Assim, adição deste antioxidante em outras concentrações, a influência de fatores externos como as características individuais de cada animal, raça ou a fração do ejaculado podem ser considerados, sendo necessários mais estudos na área.

Baseado nos resultados obtidos pode-se inferir que a utilização do ácido fítico, na concentração de 0,5 mM em meio BTS, em amostras de sêmen refrigeradas por 96 horas a 17°C não gerou redução nas reações de peroxidação lipídica, se mostrou capaz de proporcionar proteção às células espermáticas após 72 horas de refrigeração, mantendo a integridade de membrana espermática, tão essencial para a capacidade fertilizante do ejaculado.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; QIU, E.; RAKESH, S. Laboratory Assessment of oxidative stress in sêmen. **Arab Journal of Urology**, v. 16, p. 77-86, 2018.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.
- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, v. 35, p. 302–315, 1993.
- AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M.M. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 3, p. 553–561, 2009.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.
- BATHGATE, R. Antioxidant Mechanisms and their Benefit on Post-thaw Boar Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 46, n. 2, p. 23–25, 2011.
- BAUMBER, J.; BALL, B.; GRAVANCE, C.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895–902, 2000.
- BECONI, M. T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHIO, M. A. Effect of natural antioxidant on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.
- CADAVID, V. G. Efeito da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a criopreservação do sêmen de cachorros. Dissertação de mestrado apresentada Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.
- CANAN, C.; CRUZ, F.T.L.; DELAROSA F.; CASAGRANDE R.; SARMENTO, C.P.M.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1057-1063, 2011.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte, 104 p., 2013.
- COSTA, M.C.R.; SILVA, C.A.; BRIDI, A.M.; FONSECA, N.A.M.; OBA, A.; SILVA, R.A.M.; SILVA, P.A.; YWAZAKI, M.S.; DALTO, D.B. Estabilidade lipídica do pernil e da linguiça frescal de suínos tratados com dietas com alta concentração de ácido fítico. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32, p. 1863–1872, 2011

- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 15-20, 1997.
- EVENSON, D.P.; WIXON, R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 4, p. 466-472, 2006.
- FILGUEIRAS, C. T.; SOARES, A. L.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1787-1791, 2009.
- GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 61-69, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Clarendon Press**, v. 543, 1989.
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p. 664-665, 1959.
- HARBACH, A.P.R.; COSTA, M.C.R.; SOARES, A.L.; BRIDI, A.M.; SHIMOKOMAKI, M.; SILVA, C.A.; IDA, E.I. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1630-1633, 2007.
- KAKA, ASMATULLAH; KAKA, A., HARON, W., YUSOFF, R., YIMER, N., KHUMRAN, A. M., SARSAIFI, K., EBRAHIMI, M. Effect of docosahexanoic acid on quality of frozen-thawed bull semen in BioXcel extender. **Reproduction, fertility and development**, v. 29, n. 3, p. 490-495, 2017.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 896-900, 1998.
- LU, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840-860, 2010.
- LUCIO, C. F.; LUCIO, C. F.; SILVA, L. C. G.; REGAZZI, F. M.; ANGRIMANI, D. S. R., NICHI, M., ASSUMPÇÃO, M. E. O.; VANNUCCHI, C. I. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 135-140, 2016.
- MARMUNTI, M.; GUTIÉRREZ, A. M.; GAVAZZA, M.; WILLIAMS, S.; PALACIOS, A. Susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of fresh boar semen obtained from different hog farms. **Revista Veterinaria**, v. 23, p. 8-14, 2012.
- MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; AND GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v.1, p. 365-375, 2013.

- MENDEZ, M. F.; ZANGERONIMO, M. G.; ROCHA, L. G.; FARIA, B. G.; PEREIRA, B. A.; FERNANDES, C. D.; CHAVES, B. R.; MURGAS, L.D.R.; SOUSA, R. V. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. **Animal**, v. 7, p. 793–798, 2013.
- MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BORTOLIN, R.C.; MENEZES, T.A.; VARGAS, A.R.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F.; BORTOLOZZO, F.P. Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 179, p. 67–79, 2017.
- MISHRA, D.P.; SHANA, C. Estrogen induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6181–6196, 2005.
- MORAN, J.M.; MADEJON, L.; ORTEGA, F. C.; PEÑA, F.J. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 91–96, 2008.
- NOGUEIRA, B. G.; SAMPAIO, B. F. B.; SOUZA, M. I. L.; COSTA E SILVA; E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled Equine Semen. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 6, p. 1003-1010, 2015.
- NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B; BENDER, E.S.C.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista eletrônica de Veterinária**, v. 15, p. 01, 2013.
- OLIVEIRA, R. R. Utilização do ácido fólico como antioxidante natural em produtos cárneos. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2012.
- PACHECO, G.D.; SILVA, C. A. da; PINTON, P.; OSWALD, I.P. ; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Phytic acid protect porcine intestinal epithelial cells from deoxynivalenol cytotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, p. 345-347, 2012.
- PEÑA, F.J.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA, F.C.; GONZALEZ, F. L.; MACIAS, G. B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 345-349, 2009.
- PEREIRA, B. A.; CHAVES, B.R.; TELES, M.C.; PONTELO, T.P.; OLIVEIRA, C.R.; DE SOUZA, R.V.; RODRIGUEZ- GIL, J.E.; ZANGERONIMO, M.G. Chlorogenic acid improves the quality of boar semen subjected to cooled storage at 15°C. **Andrologia**, v.50, p.12978, 2018.
- PIPAN, M.; MRKUN, J.; SVETE, A. N.; ZRIMŠEK, P. ZAKOŠEK. Improvement of liquid stored boar semen quality by removing low molecular weight proteins and supplementation with  $\alpha$ -tocopherol. **Animal Reproduction Science**, v. 186, p. 52-61, 2017.
- PLACER, Z. A.; CUSHMAN, L. L.; JOHNSON, B. Connor. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. **Analytical Biochemistry**, v. 16, n. 2, p. 359-364, 1966.

RHOADES, R.; PFLANZER, R. **Human Physiology, 3rd.** Harcourt Brace and company, Orlando, 1996.

SILVA, E.O.; GEREZ, J.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Effect of phytic acid from rice and corn on morphology, cell proliferation, apoptosis and cyclooxygenase- 2 expression in swine jejunal explants. **Ciência e Agrotecnologia**,v. 38, p. 278– 285, 2014.

SILVA, E. O; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems.**Journal of Food Science**.v. 81, n. 6, p.1357-1362, 2016.

STODOLAK, B.; STARZYŃSKA, A.; CZYSZCZONÓW, M.; ZIEMBA, K. The effect of phytic acid on antioxidant stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**,v. 101, p. 1041-1045, 2007.

TAYLOR, C.T. Antioxidants and reactive oxygens species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10,p. 189-198, 2001.

ZHANG, W.;YI,K.; CHEN, C.; HOU, X.; ZHOU, X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 123-128, 2012.

ZHANG, Xiao- Gang et al. The effectsofdifferentlevelsofsuperoxide dismutase in Modena onboarsemenqualityduringliquidpreservationat 17 C. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 1, p. 55-62, 2017.

**Quadro 1** – *Setup* utilizado no HTR-IVOS 14.0 para avaliação dos espermatozoides de suínos

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Tipo de Câmara	Cell-Vu®
Temperatura da Análise (°C)	37
Campos adquiridos	30
Quadros (Hz)	60
Número de quadros	5
Contraste estático mínimo	30
Tamanho mínimo da célula (pixels)	7
Retiliniaridade (STR), limiares (%)	70
VAP cut-off ( $\mu\text{m/s}$ )	30
Mínimo progressivo VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	45
VSL cut-off ( $\mu\text{m/s}$ )	20
Intensidade da célula	125
Magnificação	1,89

Tabela 1- Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da avaliação cinética pelo sistema CASA de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fítico) ou BTS (meio BTS puro), de sêmen total, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Cinéticas	TOTAL																								
	D0					D1					D2					D3					D4				
	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p
	média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP	
MT	71.9	13.2	67.9	12.4	0.543	53.5	21.7	46.1	23.8	0.574	42.3	20.3	36.6	18.1	0.568	37.0	25.7	30.5	26.1	0.624	37.3	24.0	26.1	13.6	0.274
MP	43.8	16.4	31.9	10.2	0.104	25.6	13.0	21.6	13.5	0.556	14.9	9.7	13.9	6.7	0.814	15.1	13.9	10.9	9.7	0.489	17.6	13.0	9.6	5.5	0.279
RAPID	58.0	19.1	51.0	16.3	0.443	47.4	22.7	38.0	21.1	0.407	33.9	18.5	28.9	17.2	0.584	30.4	24.2	24.5	22.2	0.621	30.5	21.9	20.0	12.7	0.261
VAP	69.1	9.4	69.8	16.4	0.920	85.2	16.9	80.1	13.2	0.518	72.7	14.8	69.1	13.8	0.574	77.3	17.2	67.4	21.0	0.322	68.6	13.1	68.8	10.4	0.975
VSL	54.5	9.0	50.6	8.2	0.381	58.4	8.5	54.8	10.4	0.457	50.2	6.3	47.5	6.5	0.161	54.4	15.1	44.7	11.2	0.166	47.9	9.5	47.2	5.5	0.854
VCL	124.6	11.5	136.6	29.3	0.299	166.5	35.2	161.4	28.8	0.756	143.6	37.0	141.4	28.0	0.898	149.5	27.5	140.7	43.2	0.636	136.3	22.5	141.2	23.6	0.676
ALH	5.4A	0.4	6.1B	0.8	0.050	7.0	1.3	6.7	1.2	0.587	6.9	0.8	7.5	1.8	0.505	7.7	0.7	7.0	3.0	0.959	6.2	2.0	7.2	1.1	0.279
STR	79.9A	3.0	75.0B	5.6	0.048	70.3	8.6	69.8	4.5	0.959	71.8	6.8	66.7	15.3	0.574	70.5	6.1	67.9	5.2	0.370	71.9	4.2	70.1	5.2	0.472
LIN	46.0A	3.9	39.6B	3.1	0.003	37.4	6.5	35.6	2.7	0.490	39.1	10.7	42.4	13.7	0.878	39.0	8.9	35.5	6.9	0.328	38.1	4.1	36.8	6.6	0.624

MT: motilidade total (%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio( $\mu$ m/s), VSL: velocidade progressiva( $\mu$ m/s), VCL: velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça( $\mu$ m), STR: retilinearidade(%), LIN: linearidade(%). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos diluídos somente com BTS e os grupos diluídos com AF.

Tabela 2 - Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da análise morfológica e da análise de peroxidação lipídica pelo TBARS de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fítico) ou BTS (meio BTS puro), de sêmen total, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Morfológicas / TBARS	TOTAL																								
	D0					D1					D2					D3					D4				
	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p
	média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP	
*DEF Maior %	9.7	5.6	9.1	4.9	0.834	11.8	8.2	10.1	8.4	0.721	16.7	17.2	16.4	17.4	0.959	11.2	7.4	10.2	8.6	0.721	11.1	9.4	10.6	7.3	0.896
**DEF Menor %	12.3	11.1	11.6	12.8	0.959	9.9	9.2	10.0	8.0	0.959	9.2	8.1	9.6	10.4	0.958	8.8	10.7	8.8	7.4	0.645	9.8	9.5	8.6	7.0	0.721
***DEF totais %	22.0	14.5	20.7	15.5	0.721	21.7	15.5	20.1	15.1	0.878	25.9	21.8	26.0	22.3	0.878	20.0	16.1	19.0	15.1	0.798	20.9	17.5	19.1	12.8	0.958
IM	9.1	3.0	10.7	6.0	0.507	7.3	2.5	8.2	4.1	0.958	6.8	2.9	9.3	2.9	0.103	7.3A	3.7	11.6B	3.4	0.029	7.4A	2.1	11.8B	4.5	0.024
TBA SP mmol/ml	7.5a	3.8	8.1	5.2	0.806	6.6	5.0	8.6	7.2	0.532	11.3	7.8	7.4	4.2	0.229	9.7	6.5	10.2	6.1	0.888	5.5	2.9	6.4	4.0	0.618
TBA SG mmol/ml	7.9a	5.3	5.6	2.4	0.279	7.8	3.9	7.1a	4.7	0.442	10.4	8.8	7.5	4.1	0.798	6.9	1.6	7.8	4.0	0.591	8.7	4.0	7.6	3.4	0.547

\*DEF maior – defeitos maiores, \*\*DEF menor – defeitos menores, \*\*\*DEF totais – defeitos morfológicos totais; TBA SP- TBARS espontâneo ( $\mu$ mol de MDA/ml); TBA SG– TBARS induzido ( $\mu$ mol de MDA/ml). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos diluídos somente com BTS e os grupos diluídos com AF.

Tabela 3 - Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da avaliação cinética pelo sistema CASA de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fítico) ou BTS (meio BTS puro), centrifugado a 600g/10 min, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Cinéticas	Centrifugado																								
	D0					D1					D2					D3					D4				
	AF		BTS		val or p	AF		BTS		val or p	AF		BTS		val or p	AF		BTS		val or p	AF		BTS		val or p
mé dia	$\pm$ D P	mé dia	$\pm$ D P	mé dia		$\pm$ D P	mé dia	$\pm$ D P	mé dia		$\pm$ D P	mé dia	$\pm$ D P	mé dia		$\pm$ D P	mé dia	$\pm$ D P	mé dia		$\pm$ D P	mé dia	$\pm$ D P	mé dia	
MT	43.5	17.3	24.9	20.5	0.070	24.1	22.0	15.8	16.6	0.404	17.0	18.5	10.8	10.3	0.382	16.1	20.0	11.1	18.1	0.645	12.6	11.1	8.6	8.0	0.130
MP	24.0	15.0	12.0	13.0	0.240	11.6	11.7	11.6	8.5	0.338	7.5	7.3	3.1	2.4	0.442	6.8	9.0	4.0	2.8	0.721	4.6	2.2	2.1	0.3	0.93
RAPID	36.3	17.6	19.1	17.3	0.337	21.5	19.9	12.6	13.4	0.313	13.4	15.2	7.6	7.5	0.458	13.5	18.0	14.8	14.5	0.505	10.5	9.9	5.1	7.1	0.235
VAP	72.0	14.6	70.0	20.9	0.833	70.1	30.8	46.4	39.2	0.161	61.5	26.9	45.7	30.0	0.161	55.5	37.6	44.5	37.4	0.721	60.0	29.7	43.1	38.3	0.341
VSL	52.1	9.2	46.7	8.8	0.247	45.8	20.5	27.6	24.7	0.132	39.1	17.4	31.7	20.3	0.382	35.5	23.0	28.5	24.1	0.574	39.7	18.4	28.7	25.7	0.341
VCL	14.1	21.5	14.9	40.8	0.721	14.5	62.1	90.6	86.3	0.166	13.3	59.2	10.0	71.4	0.279	11.7	78.0	92.0	78.0	0.574	12.7	74.2	98.1	82.8	0.798
ALH	0.5	9.9	6.1	1.1	0.667	3.5	4.4	4.2	1.1	0.610	3.5	4.4	3.9	3.0	0.382	3.4	3.9	3.4	3.9	0.878	3.5	3.5	3.8	3.6	0.361
STR	74.1	4.5	71.4	10.0	0.490	58.3	24.9	35.6	34.3	0.279	57.5	24.1	53.7	34.0	0.798	50.1	31.7	42.3	35.2	0.645	61.1	28.0	42.3	35.2	0.382
LIN	39.0	4.7	35.1	8.3	0.272	28.8	12.9	17.3	16.0	0.137	29.0	13.2	30.0	27.4	0.645	25.4	16.0	22.3	19.1	0.645	35.0	26.4	19.5	17.5	0.188

\*MT: motilidade total(%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio( $\mu$ m/s), VSL: velocidade progressiva( $\mu$ m/s), VCL: velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça( $\mu$ m), STR: retilinearidade(%), LIN: linearidade(%). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos diluídos somente com BTS e os grupos diluídos com AF.

Tabela 4 - Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da análise morfológica e da análise de peroxidação lipídica pelo TBARS de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fítico) ou BTS (meio BTS puro), centrifugado a 600g/10 min, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Morfológicas / TBARS	Centrifugado																								
	D0					D1					D2					D3					D4				
	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p
	média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	
*DEF Maior %	10.2	4.4	8.3	5.6	0.456	8.7	4.6	9.3	5.9	0.817	13.8	15.7	13.3	14.4	0.959	8.9	6.1	10.4	6.5	0.642	9.4	6.0	8.8	6.1	0.840
***DEF totais %	8.5	8.0	10.5	7.4	0.505	10.4	7.9	9.6	7.2	0.833	7.4	6.0	7.3	7.8	0.721	8.3	7.7	7.9	6.5	0.798	7.4	7.8	9.1	7.7	0.505
***DEF totais %	18.7	10.7	18.8	10.7	0.959	19.1	9.9	18.9	10.7	0.878	21.1	17.5	20.6	18.9	0.721	17.2	11.4	18.3	11.9	0.959	16.9	11.8	17.9	12.6	0.798
IM	10.6	4.4	14.6	10.0	0.505	9.3	3.1	14.6	13.8	0.574	21.5	30.0	16.4	16.9	0.645	10.0	3.2	20.9	27.0	0.279	9.8	3.0	22.8	31.3	0.105
TBA SP mmol/ml	3.4	2.8	3.9	2.1	0.680	2.9	1.9	5.0	4.0	0.218	2.9	1.7	2.4	1.6	0.543	4.0	2.7	2.3	1.8	0.170	2.9	1.7	1.7	1.1	0.125
TBA SG mmol/ml	3.9	1.3	3.7	1.3	0.731	3.4	1.8	4.4	2.5	0.402	4.3	2.0	3.7	1.8	0.527	4.1	2.4	3.7	1.3	0.686	4.4	2.4	5.0	2.9	0.656

\*DEF maior – defeitos maiores, \*\*DEF menor – defeitos menores, \*\*\*DEF totais – defeitos morfológicos totais; TBA SP- TBARS espontâneo ( $\mu$ mol de MDA/ml); TBA SG – TBARS induzido ( $\mu$ mol de MDA/ml). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos diluídos somente com BTS e os grupos diluídos com AF.

Tabela 5 - Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da avaliação cinética pelo sistema CASA de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fítico) ou BTS (meio BTS puro), filtrado com *Sperm-filter*<sup>®</sup>, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Cinéticas	FILTRADO																								
	D0					D1					D2					D3					D4				
	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p
	média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP	
MT	45.4	22.1	35.3	24.6	0.401	22.8	20.0	18.5	15.1	0.639	15.8	18.4	17.9	15.7	0.958	14.3	17.3	15.4	15.0	0.798	15.8	21.3	9.1	8.9	0.959
MP	23.5	14.4	17.6	15.8	0.450	11.4	12.6	8.1	8.0	0.721	5.3	6.4	6.4	5.7	0.574	5.6	7.1	5.4	6.1	0.878	7.1	10.1	2.5	3.2	0.574
RAPID	34.1	18.7	26.6	21.9	0.474	20.9	19.3	15.1	12.6	0.492	13.5	17.3	14.6	13.0	0.878	12.3	16.1	11.8	11.7	0.798	13.0	19.6	6.1	6.2	0.878
VAP	68.2	15.1	71.5	19.3	0.959	77.5	17.1	66.8	30.5	0.400	74.4	16.2	63.2	27.5	0.645	52.5	36.2	66.2	29.8	0.328	48.6	31.8	59.6	28.4	0.645
VSL	51.2	8.9	52.4	15.4	0.959	54.5	8.3	44.8	18.9	0.328	47.8	7.1	41.8	17.7	0.645	35.0	22.6	41.8	18.7	0.442	33.2	21.7	36.5	16.5	0.959
VCL	132.1	25.7	149.0	33.5	0.278	157.5	39.2	138.0	61.9	0.505	156.8	38.8	135.3	58.9	0.645	109.5	78.2	136.6	60.3	0.452	112.8	77.4	135.1	72.1	0.560
ALH	5.5A	0.8	6.8B	1.3	0.033	6.6	1.4	6.1	2.8	0.878	7.4	0.9	6.4	2.7	0.878	4.9	3.4	6.2	2.7	0.442	4.2	3.5	6.4	2.7	0.083
STR	76.9	4.1	74.8	4.0	0.308	72.6	7.9	60.6	25.7	0.328	68.4	5.9	59.0	24.2	0.574	52.6	33.4	57.6	23.7	0.959	52.8	32.8	57.3	24.5	0.878
LIN	40.8	4.1	36.9	3.6	0.064	36.9	5.7	29.9	12.5	0.234	35.1	10.7	28.4	11.8	0.878	27.8	20.1	30.0	12.9	0.721	26.5	16.7	28.9	13.6	0.959

MT: motilidade total(%), MP: motilidade progressiva (%), RAPID: espermatozoides com movimentos rápidos (%), VAP: velocidade do percurso médio( $\mu$ m/s), VSL: velocidade progressiva( $\mu$ m/s), VCL: velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s), ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça ( $\mu$ m), STR: retilinearidade (%), LIN: linearidade (%). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos diluídos somente com BTS e os grupos diluídos com AF.

Tabela 6 - Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados da análise morfológica e da análise de peroxidação lipídica pelo TBARS de amostras de ejaculado de suíno em meio diluente AF (meio BTS acrescido de 0,5 mM de ácido fítico) ou BTS (meio BTS puro), filtrado com *Sperm-filter*<sup>®</sup>, em cinco momentos a fresco (D0) e refrigerado por 24 (D1), 48 (D2), 72 (D3) e 96 h (D4) a 17 °C.

Variáveis Morfológicas / TBARS	FILTRADO																								
	D0					D1					D2					D3					D4				
	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p	AF		BTS		valor p
	média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP		média	$\pm$ DP	média	$\pm$ DP	
*DEF Maior %	10.7	6.1	9.2	4.3	0.581	10.6	6.2	10.6	6.4	0.984	16.3	16.8	16.6	15.6	0.959	9.1	5.9	10.7	6.7	0.628	9.7	6.5	11.6	9.5	0.641
***DEF totais %	10.8	12.2	10.1	10.2	0.959	10.9	11.7	10.4	10.0	0.959	10.3	11.2	10.4	9.0	0.959	8.9	11.0	8.8	8.8	0.721	10.2	8.9	10.1	8.7	0.989
***DEF totais %	21.4	16.3	19.3	13.1	0.959	21.5	16.2	21.1	14.2	0.798	26.6	22.6	27.0	22.9	0.959	18.1	15.5	19.5	14.6	0.645	19.9	13.2	21.8	17.0	0.959
IM	11.6	5.3	13.9	4.5	0.161	13.6	9.2	10.9	3.2	0.959	13.3	6.3	16.9	10.3	0.442	19.9	18.2	17.3	13.2	0.798	21.0	32.3	23.4	25.2	0.328
TBA SP mmol/ml	3.7	3.2	2.9	0.9	0.645	4.6	2.9	4.1	3.5	0.765	5.9	4.4	2.7	0.9	0.195	3.5	1.2	4.3	2.5	0.410	3.8	2.8	3.8	2.9	0.798
TBA SG mmol/ml	5.2	2.6	3.1	1.3	0.061	6.0	5.0	4.6	2.0	0.490	6.3	3.9	4.2	2.1	0.200	3.6	2.5	6.2	3.9	0.083	5.9	3.9	4.9	3.9	0.574

\*DEF maior – defeitos maiores, \*\*DEF menor – defeitos menores, \*\*\*DEF totais – defeitos morfológicos totais; TBA SP- TBARS espontâneo ( $\mu$ mol de MDA/ml); TBA SG – TBARS induzido ( $\mu$ mol de MDA/ml). Letras maiúsculas demonstram diferença entre os grupos diluídos somente com BTS e os grupos diluídos com AF.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização deste estudo foi possível concluir que um melhor conhecimento dos efeitos do plasma seminal sobre as células espermáticas são necessários para otimizar a separação do plasma seminal. A separação do plasma seminal se mostrou essencial para diminuir os níveis de estresse oxidativo, e desta forma a técnica de filtração do sêmen de suíno com o SpermFilter<sup>®</sup> mostrou-se como uma alternativa eficiente para a remoção do plasma seminal especialmente em amostras de sêmen a fresco.

Este estudo foi o primeiro a avaliar a adição do antioxidante ácido fólico ao meio diluente BTS de sêmen de suínos, e com os resultados obtidos pode-se inferir que a utilização do ácido fólico, na concentração de 0,5 mM em meio BTS, em amostras de sêmen refrigeradas por 96 horas a 17°C, proporcionaram proteção às células espermáticas, mantendo a integridade de membrana espermática, embora não tenha demonstrado ação antioxidante nesta concentração, e novos estudos devem ser conduzidos para avaliar o efeito de maiores concentrações de ácido fólico no meio diluente BTS para suínos.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 121/2017

Londrina, 16 de Outubro de 2017.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: “**Preservação de sêmen de suíno: separação do plasma seminal com o sperm filter e adição do ácido fólico no meio de refrigeração.**” protocolo CEUA n°19758.2017.56 sob a responsabilidade de **Maria Isabel Mello Martins**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **10/10/2017**

O objetivo do projeto é avaliar a eficiência da separação do plasma seminal por filtração e o efeito da adição de ácido fólico ao diluente de refrigeração de sêmen de suíno nas células espermáticas refrigeradas por 72 horas. Grau de invasividade=1

Vigência do Projeto	01/10/2017 a 01/07/2018
Espécie/Inragem	Suíno / Agroceres®
N° de animais	6
Peso/Idade	250-380kg / 1 a 4,5 anos
Sexo	Machos.
Origem	Granje comercial
Amostras a serem coletadas	Ejaculado.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

  
Prof. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Prof. (a) Dr (a). Maria Isabel Mello Martins**

Responsável pelo projeto  
Departamento DCV

C/C para a Chefia do Depto. DCV

C/C para a Direção de Centro do CCA

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 401), km 310 - Fone (51) 3275-4000 FAXS - Fax 3228-6443 - Caixa Postal 19.070 - CEP 86057-970 - Internet: <http://www.uel.br>

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL