

MATHEUS BALDUINO GONÇALVES DOS REIS

**SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA EM DIETAS DE VARRÕES E SEUS
EFEITOS NA QUALIDADE DO SÊMEN, NA VASCULARIZAÇÃO E NA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TESTICULAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alysson Saraiva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R375s
2020
Reis, Matheus Balduino Gonçalves dos, 1990-
Suplementação com L-arginina em dietas de varrões e seus efeitos
na qualidade do sêmen, na vascularização e na capacidade antioxidante
testicular / Matheus Balduino Gonçalves dos Reis. - Viçosa, MG, 2020.
39 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Alysson Saraiva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.24-30.

1. Suínos. 2. Alimentação de varrões. 3. Antioxidantes. 4. Sêmen.
5. Testículos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.40855

MATHEUS BALDUINO GONÇALVES DOS REIS

**SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA EM DIETAS DE VARRÕES E SEUS
EFEITOS NA QUALIDADE DO SÊMEN, NA VASCULARIZAÇÃO E NA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TESTICULAR**

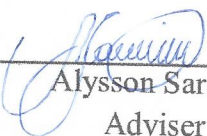
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Matheus Balduino Gonçalves dos Reis
Autor



Alysso Saraiva
Adviser

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA) pelo apoio financeiro.

Ao Professor Alysson Saraiva pela contribuição à minha formação, pelos conselhos, ensinamentos transmitidos e orientação durante o mestrado e na elaboração e execução deste trabalho.

Ao meu companheiro de pós-graduação Marcos Henrique Soares, pelo suporte intelectual nos experimentos e pesquisa, paciência e amizade.

A minha namorada Lorena, pelo suporte incondicional, por estar ao meu lado em todos os momentos e ter me acompanhado de perto durante todo o percurso do mestrado.

Aos meus pais, Sandra e Wallace, pelo amor, confiança e imensurável suporte que me proporcionam. Pois sem eles nada seria possível!

Aos companheiros de pós-graduação Gustavo, Dante, Lívia e Graziela, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho. Aos companheiros da Biologia Daniel, Fernanda e Ana Cláudia, pela ajuda na elaboração do trabalho.

Aos funcionários da UEPE em Suinocultura – UFV, pela amizade, companheirismo e ajuda na execução do experimento.

E a todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

RESUMO

REIS, Matheus Balduino Gonçalves dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Suplementação com L-arginina em dietas de varrões e seus efeitos na qualidade do sêmen, na vascularização e na capacidade antioxidante testicular.** Orientador: Alysson Saraiva.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com 1,0 % de L-arginina na qualidade espermática, na capacidade antioxidante, na histomorfometria e na expressão gênica testicular de varrões. Foram utilizados 16 suínos machos híbridos comerciais ($208,71 \pm 2,30$ kg, 300 dias de idade), distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em dois tratamentos, ração basal (CON) e CON + 1,0% de L-arginina (ARG), com 8 repetições e um animal por unidade experimental. Os animais foram suplementados por 60 dias e as amostras de sêmen coletadas ao 45º, 52º e 59º dia de experimento. Em seguida, as características seminais foram analisadas quanto ao vigor, motilidade (%), concentração ($10^6/\text{mL}$) e volume (mL), por 3 semanas (1 coleta por semana) e morfologia espermática. Ao final do experimento, os animais foram castrados e amostras foram coletadas dos testículos para análises de marcadores de estresse oxidativo, histomorfométricas e de expressão gênica. Os animais alimentados com ração ARG não apresentaram diferença ($P > 0,05$) quanto à motilidade e vigor avaliados no sêmen resfriado. Igualmente, a morfologia espermática não apresentou diferença ($P > 0,05$) para os defeitos maiores, menores e totais. A avaliação do perfil oxidativo testicular para enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), proteína carbonilada, malondialdeído e relação nitrito/nitrato também não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela suplementação com L-arginina. Em contrapartida, houve aumento ($P < 0,05$) da proporção de vasos sanguíneos e núcleos de células de *Leydig* e redução ($P < 0,05$) do tecido conectivo nos varrões suplementados com ração ARG. A expressão gênica das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2 e GSHPx não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela suplementação com L-arginina. No entanto, os animais ARG apresentaram redução ($P < 0,05$) na expressão da NADPH oxidase. A inclusão de 1,0% de L-arginina na ração varrões promove aumento na angiogênese testicular e na capacidade transcripcional das

células de *Leydig*, e pode contribuir para redução da produção de radicais livres em nível testicular.

Palavras-chave: Suínos. L-arginina. Antioxidante. Varrões. Sêmen. Testículos.

ABSTRACT

REIS, Matheus Balduino Gonçalves dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **L-arginine supplementation in boar diets and its effects on semen quality, vascularization and testicular antioxidant capacity.** Adviser: Alysson Saraiva.

This work was conducted with the objective of evaluating the influence of supplementation with 1.0% of L-arginine (ARG) in the boar diet on sperm quality, testicular antioxidant capacity and testicular histomorfometria. 16 commercial hybrid male pigs (208.71 ± 2.30 kg BW, 300 days of age) were selected and randomly assigned, in two treatments, basal feed (CON) and basal feed (ARG - 1.0% L-arginine) with 8 replicates, one animal per experimental unity. The animals were supplemented for 60 days and the seminal sample were collected at the 45th, 52th and 59th experimental day. Then, the semen characteristics were evaluated (vigor, motility (%), concentration (10^6 /ml) and volume (mL)), were analyzed for 3 weeks (1 collection per week) and sperm morphology was evaluated. The testicular samples were collected at the end of the experiment, after the animals were castrated, the left testis was used for analysis of oxidative stress and nitrite/nitrate, the right fixed in resin for histomorfometry analysis. The results showed that vigor and motility were not significantly affected ($P > 0.05$). Similarly, the sperm morphology showed no difference for major, minor and total defects ($P > 0.05$). The evaluation of the testicular oxidative profile, enzymes, oxidative stress markers (PC and MDA) and nitrite/nitrate did not show any difference for ARG fed boars ($P > 0.05$). In contrast, the histomorphometric evaluation indicated an increase in the proportion of blood vessels and *Leydig* cell nucleus ($P < 0.05$), also show a connective tissue reduction ($P < 0.05$) for ARG boars. The gene expression of the antioxidant enzymes SOD1, SOD2 and GSHPx were not influenced by supplementation with L-arginine. However, ARG boars had a reduction in NADPH oxidase expression. The inclusion of 1.0% L-arginine in the boar diet promotes an increase in testicular angiogenesis and in the transcriptional capacity of *Leydig* cells, and may contribute to decrease the production of free radicals at the testicular level.

Keywords: Swine. L-arginine. Antioxidant. Boars. Semen. Testicles.

SUMÁRIO

Introdução	8
Material e Métodos.....	9
Animais, delineamento e rações experimentais.....	9
Coleta e avaliação do sêmen	10
Características morfológicas do sêmen.....	11
Diluição do sêmen	11
Coleta de Amostras.....	12
Análise do perfil oxidativo e relação nitrito/nitrato.....	12
Análises histológicas.....	14
Análise estatística	16
Resultados.....	16
Ambiente térmico	16
Características morfológicas do sêmen fresco.	17
Avaliação do sêmen resfriado	17
Análise do perfil oxidativo e relação nitrito/nitrato.....	17
Análises histológicas.....	17
Discussão.....	18
Avaliação do sêmen resfriado.	19
Análises histológicas.....	21
Referências	24
ANEXO.....	39

Introdução

Os varrões tem sido uma categoria negligenciada dentro do sistema produtivo suinícola, sendo constantemente alimentados com ração de matrizes, apesar da relevante influência na reprodução. No entanto, a qualidade seminal e a vitalidade do reprodutor estão diretamente relacionadas a nutrição. Na última década, houve aumento pela demanda de sêmen com características qualitativas e quantitativas que permitissem o processamento de uma dose inseminante eficaz, assegurando a fertilidade e transmitindo à progênie características necessárias para ótimo desempenho (ESTIENNE; CRAWFORD, 2008). Desta forma, diferentes estratégias nutricionais têm sido avaliadas com o intuito de melhorar a qualidade seminal, dentre as quais, a suplementação com L-arginina tem potencial promissor na dieta de varrões.

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo da membrana plasmática dos espermatozoides tem sido um dos principais problemas de subfertilidade em machos (HAMMERSTEDT, 1993; GUERRA *et al.*, 2004; AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2007). A elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), pode resultar em aumento da peroxidação lipídica da membrana dos espermatozoides (BILODEUA *et al.*, 2002; SRIVASTAVA *et al.*, 2006) o que ocasiona redução da viabilidade espermática, além de reduzir o número de espermatozoides no testículo e epidídimo, diminuindo também a produção diária espermática, com consequente atrofia das células de *Leydig* e patologias no testículo (SANGHAMITRA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a arginina se destaca por ter papel importante na capacidade antioxidante da célula, sendo capaz de aumentar a via de sinalização para síntese de enzimas antioxidantes (NGUYEN *et al.*, 2009; LU, 2009, 2013; LI *et al.*, 2016; LIANG *et al.*, 2018). Ademais, a arginina possui diversas funções no metabolismo animal, sendo utilizada como intermediária no ciclo da ureia e como precursora da síntese de vários compostos metabólicos importantes incluindo o óxido nítrico (ON) (WU; MORRIS, 2007; KIM *et al.*, 2007).

O ON é sinalizador intracelular de meia vida curta sintetizado em diferentes tipos de células, pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). No sêmen, o ON é capaz de ativar a guanilato ciclase (GC) e gerar GMPc, que promove a ativação de proteínas quinases, desta forma, é capaz de regular a motilidade, a viabilidade e

a capacitação espermática (BUZADZIC *et al.*, 2015). Além disso, tem efeito sobre o tecido testicular, atuando na angiogênese e na dilatação endotelial, com melhora na perfusão sanguínea nos tecidos (SAMEL *et al.*, 2003).

Portanto, o uso de estratégias nutricionais que atenuem o estresse oxidativo e aumente a perfusão sanguínea testicular pode promover melhora nas características seminais e na fertilidade de varrões. Desta forma, a hipótese é de que a suplementação em dietas de varrões com L-arginina (ARG) melhora a qualidade espermática, aumenta a vascularização e atenua o estresse oxidativo testicular.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com 1,0 % de ARG na ração de varrões na qualidade espermática, na histomorfometria e na capacidade antioxidante testicular.

Material e Métodos

Todos os métodos envolvendo a manipulação dos suínos seguiram os princípios éticos da pesquisa com animais (CONCEA, 2016) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 069/2017).

Animais, delineamento e rações experimentais

O experimento foi conduzido no galpão de reprodução da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Foram utilizados 16 varrões Agroceres PIC 415 ao início do experimento com 300 dias de idade e peso inicial de $208,71 \pm 2,3$ kg, ao final idade de 360 dias e peso de $228,84 \pm 6,2$ kg. Os animais foram treinados para a coleta de sêmen em manequim fixo por um período de dois meses antecedentes ao início do estudo.

Os varrões foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em dois tratamentos, com oito repetições e cada animal foi considerado uma unidade experimental. Os tratamentos foram ração basal (CON) formulada para atender as

exigências nutricionais de machos reprodutores suínos (Tabela 1), de acordo com o manual da genética Agrocere PIC (2012) e ração CON suplementada 1,0% de L-arginina (ARG, Ajinomoto, Saga, Japan).

Os animais foram alojados durante o período experimental de 60 dias em baias individuais com 2,9 metros de largura por 4,0 metros de comprimento, com densidade animal de 1.6 m²/animal, dotadas de comedouros semiautomáticos e bebedouros tipo chupeta; localizadas em galpão de alvenaria, com piso de concreto e coberto com telhas de cerâmica.

As condições ambientais no interior do galpão foram monitoradas diariamente através de termômetro de máxima e mínima, mantido em uma baia vazia no centro galpão, à meia altura do corpo dos animais.

As rações foram fornecidas de forma controlada, na quantidade de 2,0 kg/dia a cada animal, divididos igualmente em dois horários de fornecimento às 7:00 e 17:00 horas. Os varrões tiveram livre acesso à água durante todo o período experimental e consumiram toda a ração ofertada.

Coleta e avaliação do sêmen

Foram realizadas com 345 dias de vida, três coletas de sêmen por animal, uma vez por semana, ao 45º, 52º e 59º dia experimental, para garantir que tenha ocorrido um ciclo completo de espermatogênese, uma vez que a duração deste ciclo em suínos é de aproximadamente 41 dias (FRANÇA et al., 2005).

O sêmen foi coletado através do método da estimulação com a mão enluvada, em copo plástico térmico pré-aquecido a 38°C, graduado, contendo saco coletor, protegido da variação da temperatura e da luz, coberto por camada dupla de filtro para a separação da fração gelatinosa do sêmen (CBRA, 2013).

Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi levado ao laboratório para avaliação da concentração, volume, total de espermatozoides, vigor e motilidade espermática, utilizando-se microscópio óptico (Olympus CX40, Tokyo, Japan). Somente ejaculados com valores maiores ou iguais a 70% de motilidade foram processados (TONIOLLI et al., 2005).

A classificação do vigor espermático foi feita de acordo com Ferreira Neto et al. (1977), com uso de microscópio óptico (Olympus CX40, Tokyo, Japan), com escore variando

0 a 5, de forma que 0 representa total imobilidade espermática e 5 representa movimentação intensa, vigorosa e progressiva.

A avaliação da concentração espermática foi feita de acordo com a metodologia proposta por Martin Rillo *et al.* (1996), com uso de microscópio óptico (Olympus CX40, Tokyo, Japan) e câmara de *Neubauer*, multiplicando o número total de células pela concentração e volume do ejaculado.

O volume do ejaculado foi medido diretamente pela graduação do copo coletor, sendo a porção gelatinosa retirada.

Características morfológicas do sêmen

A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada seguindo a técnica de preparação úmida para avaliação morfológica espermática de acordo com Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013) foi realizada para 6 animais do grupo CON e 8 animais do grupo ARG. As Alíquotas de 40 μ L de sêmen fresco, foram adicionadas em 1mL de formol-salino (HANCOCK, 1957), tamponado e estocadas a temperatura ambiente para análises. Foram contadas 100 células com auxílio de microscópio óptico com contraste de fase (Olympus CX43, Tokyo, Japan), para a determinação do percentual de anormalidade espermática, de modo a classificar defeitos maiores e menores (BLOM, 1973).

Diluição do sêmen

Logo após a coleta, o sêmen foi avaliado e diluído em *Beltville Thawing Solution* (BTS). O diluente foi preparado 30 min antes da diluição e mantido em banho-maria a uma temperatura de 37° C. Determinou-se em câmara de *Neubauer* a diluição do sêmen para concentração de 3×10^9 espermatozoides em um volume final de 250 mL contendo BTS e sêmen, com agitação constante do frasco até a mistura completa. Após diluição o sêmen foi acondicionado em recipientes próprios, fracionado em 5 amostras de 50 mL, refrigeradas a 20°C por 1 hora e posteriormente, armazenados à temperatura entre 15 a 17° C em conservadora de sêmen (Consuitec®, Paulínia-SP, Brasil), constantemente agitadas para melhor conservação da qualidade seminal. Após 72 horas de armazenamento, esta fração

resfriada foi encaminhada ao laboratório para posteriores análises de vigor e motilidade (TONIOLLI *et al.*, 2005).

Coleta de Amostras

Ao final do experimento, realizou-se a contenção dos animais, para a anestesia geral, foi utilizado Cloridato de Cetamina 10 mg/kg (Dopalen, Ceva Paulínia-SP, Brasil) e Diazepam (Diazepam®) 1 mg/kg, intravenoso.

Os animais foram submetidos à orquiectomia bilateral, usando o procedimento de rotina. No pós-operatório, os animais receberam medicação pós-operatória de 1 mg/kg de diclofenaco intramuscular e 20 mL de Penicilina (Megacilin Plus injetável), por via intramuscular, repetido 48 horas após a primeira aplicação. Os varrões foram soltos em suas baias e observados até completarem a recuperação da cirurgia e voltarem a seu comportamento natural.

Os testículos após a extração foram limpos em solução fisiológica. Amostras de tecido do testículo esquerdo foram coletadas para análise de perfil oxidativo, relação nitrito/nitrato e de expressão gênica e armazenados a -80°C . Foram preparadas amostras extraídas dos tecidos testiculares de cada varrão, foram pesados 100 mg e homogeneizadas em 1000 μL de tampão fosfato (pH 7,4). O homogenato foi centrifugado (Eppendorf® 5702R) por 10 minutos à 4°C , à 12000 rpm. Após a formação do sobrenadante foi analisado a atividade do perfil oxidativo e relação nitrito/nitrato.

Os testículos direito foram pré-fixados em paraformaldeído 4% para coleta dos segmentos de $2,0\text{ cm}^2$, em seguida, esses fragmentos foram pós-fixados em solução de paraformaldeído 4% por 4 horas, transferidos após esse período para álcool 70% e armazenados para análises posteriores.

Análise do perfil oxidativo e relação nitrito/nitrato

A atividade enzimática da SOD foi determinada de acordo com Dieterich *et al.* (2000), em leitor de Elisa em 570 nm, baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação de conversão do superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

A atividade da CAT foi mensurada pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT em um ensaio cinético contínuo, em espectrofotômetro após o desaparecimento de H₂O₂ a 240 nm na faixa de 5 a 50 mM, durante 60 segundos, de acordo com metodologia proposta por Aebi et al. (1984). A atividade da CAT foi expressa em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da glutathione transferase (GST) foi analisada de acordo com Habig et al. (1974), através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CDNB 1 mM em etanol, Glutathione Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorvência ($\lambda = 340$ nm) por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar do CDNB $\epsilon_{340} = 369,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para o cálculo e os resultados expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$.

A extensão da peroxidação lipídica foi avaliada através da concentração de malondialdeído (MDA). Resumidamente, 0,2 ml do sobrenadante do homogenato testicular foi homogeneizado em 0,4 ml TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375%, ácido clorídrico 0,6%). A reação foi em água fervente por 40 minutos a temperatura de 90°C. Depois de resfriada, adicionou-se álcool butílico (0,6 mL) e centrifugou-se a 6000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi usado para medir a absorvência a 535 nm em um espectrofotômetro de varredura de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). A concentração de MDA foi determinada usando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína como proposto por Buege e Aust, (1978).

A proteína carbonilada (PC), foi determinada utilizando o procedimento 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (LEVINE *et al.*, 1994). O sobrenadante do homogenato descrito acima foi adicionado a 0,5 ml de solução DNPH 10 mmol/L diluída em ácido clorídrico (7%), homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de TCA a 10% a cada tubo, centrifugou-se a 5000 g, por 10 min a 4 ° C e rejeitou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado 3 vezes com 1 mL de acetato de etila e etanol (1:1 v/v). Por fim, adicionou-se 1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 6%, agitou-se os tubos para dissolver o sedimento e mediu-se o sobrenadante por absorvência a 370 nm

(Multiskan GO, Thermo Scientific). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína com base no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$.

A proteína total dos sobrenadantes de SOD, CAT, MDA e PC foi mensurada segundo Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Para a conversão da unidade de medida em miligrama de proteína por grama de tecido testicular.

A quantificação dos níveis de nitrito/ nitrato pode ser correlacionada com a produção de óxido nítrico. Deste modo foi feita a quantificação dos níveis de nitrito/nitrato no tecido testicular de acordo com a metodologia da reação padrão de Griess (TSIKAS, 2007). Brevemente, 50 μL do sobrenadante obtido do homogenato testicular descrito acima, foi incubado com o mesmo volume do reagente Griess (1% sulfanilamida, 0.1% N-(1- Naftil) etilenodiamina, e 2.5% H_3PO_4) a temperatura ambiente, por 10 min. A absorbância foi mensurada a 540 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). A conversão da absorbância foi obtida da curva padrão do nitrito de sódio (0–100 μM) e expressa em concentração micromolar da relação nitrito/nitrato ($\mu\text{mol/L}$).

Análises histológicas

A partir dos cortes histológicos dos testículos fixados em solução de paraformaldeído 4,0%, foram feitos cortes transversais nesses segmentos, que foram desidratados em gradientes crescentes etílicos e embebidos em resina plástica (Historesin®; Leica Microsystems, Nussloch, Germany), em dois banhos e incluídos na mesma resina com acréscimo de endurecedor para confecção de blocos de resina. Foram obtidos cortes transversais com 3 μm de espessura por meio de micrótomo rotativo (RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch, Germany) utilizando navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina/borato de sódio a 1,0%, por 1 minuto.

Para a identificação das alterações em nível celular e tecidual, foi feita a histomorfometria testicular, de forma a analisar a morfometria intertubular e tubular dos testículos.

A análise da estereologia, proporção volumétrica dos componentes intertubulares (núcleo e citoplasma de célula de *Leydig*, vasos sanguíneos e tecido conectivo), foi obtida pela contagem de 1000 pontos, por animal, por imagens projetadas dos intertúbulos dos testículos (SOUZA *et al.*, 2016). O diâmetro do nuclear das células de *Leydig* foi obtido pela

mensuração de 30 núcleos/animal. O volume do núcleo, citoplasma e total das células de *Leydig* foi calculado de acordo com Mori e Christensen (1980).

Para a morfometria tubular foi analisado o diâmetro e a altura, com a mensuração randômica de 12 cortes por animal, pela análise de micrômetro de grade linear (U-OCMSQ10/10, Olympus) de acordo com VALENÇA et al. (2013) e SOUZA et al. (2015). Nestas etapas, foi utilizado microscópio trinocular Olympus® BX50 com câmera acoplada (CMOS 1,3MP BioCAM) e as imagens foram analisadas com o programa Image Pro-Plus®, versão 4.5 para Windows 98.

Análises de expressão gênica

O RNA total foi extraído a partir de 50 mg de amostra do testículo esquerdo dos animais utilizando TRIzol® (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA das amostras foi estimada em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Munique, Alemanha), observando-se as razões A260/A280 entre 1.8 e 2.0 como controle de pureza. A verificação da qualidade e a integridade do RNA extraído foi realizada por meio do gel de agarose 1%. Posteriormente, as amostras foram reversamente transcritas em DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription (RT) (Promega, Madison, WI), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a - 20 °C até o uso na reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Os primers foram projetados por meio do programa PrimerQuest fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir das sequências gênicas obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para produzir um produto para amplificação (Tabela 2).

Para análises de normalização, realizada para minimizar as possíveis variações quanto a quantidade de RNAm inicial e a eficiência da transcrição reversa, foram utilizados os genes *ACTB*, *HPRT1* e *GAPDH*. A escolha do gene endógeno foi baseada na eficiência de amplificação dos genes candidatos a partir do cálculo da eficiência para cada par de primer (nas concentrações de 100, 200 e 400 mM) por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta}) - 1}$, onde E é a eficiência da reação (Pfaffl, 2001). Além disso, o perfil das curvas de amplificação, de dissociação e a estabilidade de amplificação destes genes entre os

tratamentos foram utilizados como parâmetros de avaliação. Os genes normalizadores não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Desse modo, o gene *GAPDH* foi escolhido como endógeno devido à sua maior expressão e estabilidade entre os tratamentos.

As análises de RT-qPCR foram efetuadas utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), por meio do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR® Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações de PCR foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final da análise, foi obtido os valores de “threshold cycle” (Ct), o qual foram posteriormente normalizados (ΔCt) com base nos valores de Ct obtidos para o gene *GAPDH*. O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi realizado de acordo com o método 2- ΔCt (Livak and Schmittgen, 2001).

Análise estatística

Cada animal foi considerado uma unidade experimental para análise de todas as variáveis. Os dados foram analisados utilizando-se o Software estatístico SAS 9.0, licenciado para a UFV. Para as variáveis de características seminais foi utilizado o PROC MIXED e incluído o efeito corrigido do período e suas interações com os tratamentos. Para resultados diferentes, as médias foram comparadas pelo teste Tukey-Kramer. Para a comparação das médias das demais variáveis foi realizada a ANOVA, por meio do PROC GLM. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

Ambiente térmico

As médias das temperaturas máxima e mínima no interior do galpão durante o estudo foram $28,5 \pm 2,7^\circ\text{C}$ e $20,9 \pm 1,4^\circ\text{C}$, a temperatura média foi de $24,6 \pm 1,7^\circ\text{C}$ (Figura 1).

Características morfológicas do sêmen fresco.

O percentual de defeitos maiores foi semelhante ($P > 0,05$) entre os animais suplementados com ARG e os animais que receberam a ração CON. Também não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) com a suplementação de L-arginina para os defeitos menores e defeitos totais do sêmen (Tabela 3).

Avaliação do sêmen resfriado

No sêmen resfriado não foram verificados efeitos ($P > 0,05$) no percentual de motilidade, assim como também não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os períodos de coleta (Tabela 4).

Análise do perfil oxidativo e relação nitrito/nitrato.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, GST e CAT no tecido testicular foi semelhante ($P > 0,05$) entre os animais que consumiram a ração ARG ou CON (Tabela 5). Da mesma forma, não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) nas concentrações de MDA e PC entre os animais alimentados com ARG ou CON (Tabela 5).

A quantificação da relação nitrito/nitrato foi similar ($P > 0,05$) entre os animais suplementados ou não com ARG.

Análises histológicas

As características do túbulo seminífero como percentual de túbulo, epitélio, túnica própria e lúmen não diferiram ($P > 0,05$) entre o grupo CON e ARG. De forma semelhante, também não houve diferença ($P > 0,05$) para as medidas de diâmetro tubular e altura do epitélio (Tabela 6).

A proporção volumétrica de intertúbulo foi à mesma ($P > 0,05$) entre os grupos, entretanto, a composição dos seus elementos diferiu. A quantidade de núcleo de células de *Leydig* aumentou ($P < 0,05$) para o grupo animais suplementados com ARG em relação ao CON (Tabela 6).

Em relação ao percentual de vasos sanguíneos, os animais suplementados com ARG apresentaram maior ($P < 0,05$) percentual de vasos em relação ao grupo CON. De forma

coerente, foi observada redução ($P < 0,05$) do tecido conectivo dos animais suplementados com ARG em reação ao COM (Tabela 6)

Quanto a esteriodologia das células de *Leydig*, as variáveis volume das células de *Leydig*, volume do núcleo e volume de citoplasma dessas células foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os animais suplementados ou não com ARG (Tabela 6).

Expressão gênica

A expressão gênica das enzimas antioxidantes *SOD1*, *SOD2* e *GSH-PX* não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela suplementação com 1,0% de L-arginina (Tabela 7).

A abundância do mRNA da enzima NADPH oxidase foi influenciada pela suplementação de 1,0% de L-arginina. Os animais que receberam dietas com 1,0% de L-arginina apresentaram redução ($P < 0,05$) da expressão da NADPH oxidase.

Discussão

Características morfológicas do sêmen fresco

A produção de EROs está aparentemente mais presente em sêmen contendo alta incidência de espermatozoides morfológicamente anormais, por ser influenciada por resíduos citoplasmáticos classificados como gotas proximais e distais, os resíduos contendo mitocôndrias podem aumentar a capacidade das células imaturas de gerar NADPH, fonte de elétrons para a produção de EROs (SAID et al., 2005).

Os defeitos maiores são os de maior impacto sobre a fertilidade, sendo estes caracterizados por mal formações relacionadas ao corpo e cauda dos espermatozoides. Os defeitos menores representam as anomalias da cabeça e implantação abaxial (CHENOWETH, 2005).

No entanto, no presente estudo não foram relatadas diferenças entre os tratamentos para os defeitos morfológicos maiores, menores e totais. De forma semelhante, os estudos feitos por Gruhot *et al.* (2019) e Chen *et al.* (2018), também não identificaram influência da L-arginina sobre essas variáveis.

Avaliação do sêmen resfriado.

A L-arginina participa da formação de compostos como o ON que desempenha diversos papéis fisiológicos no espermatozoide como redução da produção do radical superóxido, reduzindo a formação de EROs e também atua como sinalizador celular regulando a motilidade e viabilidade destas células (FÖRSTERMANN, 2012; BUZADZIC et al., 2015).

No presente estudo, foi hipotetizado que a utilização de L-arginina suplementada na ração dos varrões poderia atenuar o processo oxidativo no sêmen melhorando a qualidade espermática. No entanto, no presente estudo não foi observado efeito da suplementação de L-arginina para varrões na motilidade e no vigor do sêmen resfriado. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Gruhot *et al.* (2019) que avaliaram a suplementação de 1,0% de L-arginina para varrões de 20 meses de idade durante 42 dias e também não observaram diferença entre os animais suplementados ou não com L-arginina sobre a motilidade, concentração e volume seminal. De forma divergente, Chen *et al.* (2018) avaliaram o uso de níveis crescentes de L-arginina na dieta para varrões de 13 meses de idade durante o período de 84 dias sob estresse por calor, e observaram que os níveis de 0,8 e 1,0% de L-arginina na dieta proporcionou aumento da motilidade e concentração espermática do sêmen.

Existem dois principais fatores que podem justificar a divergência entre os resultados obtidos e os observados na literatura.

O primeiro seria o tempo de suplementação. Sabe-se que o tempo necessário para que o ciclo da espermatogênese aconteça é de aproximadamente 41 dias (FRANÇA et al., 2005). No entanto, pouco se sabe a respeito do tempo de suplementação necessário para que a L-arginina promova efeitos a nível testicular e seminal. Dessa forma, contrastando com os resultados de Chen *et al.* (2018), no presente estudo, o período de suplementação de 60 dias pode ter sido insuficiente para que a arginina promovesse efeitos positivos na motilidade e no vigor do sêmen resfriado.

O segundo fator seria o contexto ambiental no qual os animais estão inseridos. A faixa na qual reprodutores não apresentam alteração na produção espermática de acordo com Li et al. (2015) é de 20 °C a 28 °C, sendo a temperatura ideal de 23 °C (STONE, 1982). No presente

estudo, os animais foram mantidos em ambiente com temperaturas abaixo da faixa prejudicial para machos reprodutores, com temperatura média do ar de 24,6 °C, mínima de 20,9 °C e com máxima de 28,5 °C. Coerente com estudo realizado por Gruhot *et al.* (2019) que da mesma forma não desafiou os animais com temperaturas do ar elevadas. Em ambos os estudos não foram observados efeitos da L-arginina sobre as características espermáticas. No entanto, Chen *et al.*, (2018), em um estudo com varrões em estresse por calor relataram que os animais suplementados com L-arginina apresentaram maior motilidade e concentração espermática, ao serem desafiados com temperaturas do ar acima de 29 °C, e de acordo com Estienne (2000) e Suriyasomboon *et al.* (2004) temperaturas acima desse valor são prejudiciais para o volume e produção de células espermáticas.

O estresse por calor prejudica a expressão de genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons, aumentando a produção de EROs (WELLER *et al.* 2013). A energia para a motilidade do espermatozoide vem quase que em sua totalidade da atividade mitocondrial, assim em situação de estresse por calor pode ocorrer intenso aumento na produção de EROs. A L-arginina e seus metabólitos estão relacionados ao aumento da capacidade antioxidante e redução da produção de EROs (FÖRSTERMANN, 2012). Desta forma, em uma situação de elevado estresse oxidativo em nível seminal, como a que ocorre em animais mantidos em estresse por calor o efeito da L-arginina pode ser mais proeminente.

Além disso, o efeito do ON sobre a vasodilatação em varrões submetidos a estresse por calor promove o aumento do fluxo sanguíneo testicular, reduzindo significativamente a temperatura testicular, favorecendo a adequada espermatogênese e a qualidade espermática (KNOX, 2003), justificando que o efeito da L-arginina pode ser mais intenso em animais mantidos em ambientes de alta temperatura.

Análise do perfil oxidativo e relação Nitrito/Nitrato.

A L-arginina e seus metabolitos como o ON possuem papéis fundamentais na capacidade antioxidante celular (PETROVIC *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2018; LIANG *et al.*, 2018), podendo reduzir o impacto negativo da elevada produção de EROs no tecido testicular.

No entanto, no presente estudo a suplementação de 1,0% de L-arginina não alterou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST no tecido testicular em comparação com o CON.

Estudos avaliando o efeito da L-arginina sobre a capacidade antioxidante no tecido testicular são escassos na literatura e se tratando da espécie suína estes estudos são ainda mais escassos. No entanto, fatores como o tempo de suplementação e a concentração utilizada podem ter sido determinantes para os resultados observados. Segundo Meldrum *et al.* (2010) altas concentrações de L-arginina são necessárias para seus efeitos sejam expressos no testículo em seres humanos. De forma coerente Duru *et al.* (2011), utilizando concentração de L-arginina semelhante à do presente trabalho, também não verificaram efeito na atividade da SOD e CAT no tecido testicular de ratos em condição de estresse oxidativo, suplementados por 56 dias.

A composição química do ON facilita sua reação com outros radicais livres, principalmente radicais peroxila (LOO^-) responsáveis pela reação de peroxidação lipídica. Ao doar elétrons ao propagador da reação LOO^- , o ON finaliza o evento da reação em cadeia, com formação do produto final pouco reativo $\text{LOON}=\text{O}$, atuando como um antioxidante (HUMMEL, *et al.*, 2006).

A demonstração da produção de ON é feita na maioria das vezes de forma indireta, isso por ser um gás incolor, de meia vida curta e apresenta rápida oxidação a nitrato (NO_2^-) e nitrito (NO_3^-). Deste modo, é mensurada a concentração e a relação de NO_3^- e NO_2^- como prova de sua produção (LAMPIAO *et al.*, 2006; FERRUSOLA *et al.*, 2009).

Porém, no presente estudo, não se constatou diferenças na relação nitrito/nitrato entre os animais suplementados com L-arginina ou os animais do grupo controle, indiretamente indicando produção semelhante de ON entre os grupos.

Análises histológicas

O aumento da vascularização testicular pode favorecer a manutenção da temperatura adequada para a espermatogênese e pode proporcionar maior suprimento de oxigênio e nutrientes para a produção espermática e hormonal.

No presente estudo foi observado aumento no percentual de vasos sanguíneos no testículo dos suínos suplementados com L-arginina.

Deste modo, pode-se inferir que o aumento no percentual de vasos sanguíneos no tecido testicular dos animais suplementados com L-arginina pode ter sido mediado por uma maior concentração de poliaminas.

Além do aumento da vascularização, foi observado que a suplementação com L-arginina implicou no aumento da proporção de núcleo de células de *Leydig* e reduziu a proporção de tecido conectivo no espaço intersticial em relação ao controle.

Possivelmente a redução da proporção de tecido conectivo no espaço intersticial foi decorrente do aumento no percentual de vasos sanguíneos observado nos animais suplementados com L-arginina.

O maior percentual de núcleos nas células de *Leydig* pode implicar em maior produção de mRNA para a síntese de andrógenos, este resultado corrobora o relato de Chen *et al.* (2018) de que a suplementação de arginina para varrões aumenta a produção de testosterona.

O maior percentual de núcleos de células de *Leydig* pode ser atribuído a maior disponibilidade de substrato para a ornitina descarboxilase (ODC), aumentando a concentração de poliaminas nas células de *Leydig*. Segundo Lefèvre *et al.* (2011), as poliaminas, principalmente a espermina, têm a capacidade de aumentar a atividade das células de *Leydig*.

Os resultados da histomorfometria demonstram que a L-arginina pode melhorar a capacidade reprodutiva de varrões. No entanto, novos estudos são necessários definir o tempo de suplementação e a concentração de L-arginina adequada. Todavia, os mecanismos pelos quais a L-arginina promove seu efeito a nível testicular e seminal também precisam melhor elucidados.

Expressão gênica

Existem evidências de que o estresse oxidativo é um importante causador de subfertilidade em varrões (Liu *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo pode ocorrer em virtude do desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de EROs do organismo. Neste sentido, os antioxidantes enzimáticos desempenham papel importante para a neutralização das EROs, que protege os tecidos testiculares e os espermatozoides dos danos oxidativo. A enzima SOD realiza a

dismutação dos radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e a GSH-Px converte os radicais peróxidos e hidroxila em formas não-tóxicas (Chen et al., 2018).

A L-arginina é frequentemente descrita como aminoácido com capacidade antioxidante, capaz de modular a expressão gênica de enzimas antioxidantes e pró-oxidantes (Liang et al., 2018; Mo et al., 2018).

Todavia, no presente estudo a suplementação dietética de 1,0% de L-arginina não foi eficiente em aumentar a expressão das enzimas antioxidantes *SOD1*, *SOD2*, e *GSH-PX 1*. Estes resultados estão coerentes com os obtidos pela análise da atividade das enzimas antioxidantes apresentados na Tabela 5.

A síntese de GSH é controlada pelo aumento da atividade da glutamato cisteína ligase (GCL) e GSH sintase (GS) (Lu, 2009; 2013). E, segundo Liang et al. (2018), a expressão gênica da GCL e GS aumentam com o aumento do fornecimento de L-arginina dietética. Deste modo, é possível que no presente estudo o fornecimento de 1,0% de L-arginina pode não ter sido suficiente para estimular maior expressão gênica de GSH no tecido testicular.

Trabalhos avaliando a expressão gênica de enzimas antioxidantes como a *SOD1* e *SOD2* no tecido testicular de animais consumindo L-arginina são escassos. Todavia, segundo Meldrum et al. (2010) para que se consiga observar os efeitos da L-arginina em nível testicular a concentração suplementada deve ser elevada. Possivelmente no presente estudo, o nível utilizado foi inferior ao necessário para expressar efeito sobre a expressão das enzimas antioxidantes.

O ânion superóxido é um radical livre que pode ser gerado por vias mitocondriais e não-mitocondriais. Sendo a NADPH oxidase a maior fonte não-mitocondrial de superóxido (Cho e Kim, 2011; Ma et al., 2015).

Produtos que consigam inibir a transferência de elétrons entre os componentes da NADPH oxidase para a formação do superóxido ou reduzir a expressão gênica de algum de seus componentes, podem atenuar o estresse oxidativo celular (Selemidis et al., 2008).

Neste sentido, a L-arginina é descrita como modulador da expressão gênica da família NADPH oxidase (Fujii et al., 2003). A inibição da NADPH oxidase pela L-arginina ocorre de forma indireta, mediada pela liberação de ON (Selemidis et al., 2008; Luo et al., 2019).

No presente estudo, a suplementação dietética de 1,0% de L-arginina foi eficaz em reduzir a expressão gênica da NADPH oxidase, o que pode resultar em menor produção do

ânion superóxido, indicando que este aminoácido pode atuar como um antioxidante em nível testicular.

Conclusão

A inclusão de 1,0% de L-arginina na ração varrões promove aumento na angiogênese testicular e na capacidade transcricional das células de *Leydig*, e pode contribuir para redução da produção de radicais livres em nível testicular.

Referências

- Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**. V. 105, p. 121-126, 1984.
- Agarwal, A.; Makker, K.; Sharma, R. Review Article: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility. **American Journal of Reproductive Immunology**. V. 59, n. 1, p. 2-11, 2007.
- Agrocere PIC. **Guia de Especificações Nutricionais para Machos e Fêmeas Agrocere PIC**, 2012.
- Amann, R.P.; Hammerstedt, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal Andrology**. V. 14, p. 397-406, 1993.
- Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Cormier, N.; Sirard, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**. V. 57, p. 1105-1112, 2002.
- Blom, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med Journal**. V. 25, p. 383-391, 1973.
- Bode-Böger S. M.; Böger R. H.; Galland, A.; Tsikas, D.; Frölich, J. C. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. **British Journal of Clinical Pharmacology**. V. 46, p. 489-497, 1998.
- Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Varisli, O.; Yuce, A.; Tekin, N.; Akcay, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**. V. 67, p. 89, 2007.
- Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods in Enzymology**. V. 2, p. 302-310, 1978.

- Buzadzic, B; M Vucetic, M; Jankovic¹, A; Stancic, A; Korac, A; Korac, B; Otasevic, V. New insights into male (in) fertility: the importance of NO. **British Journal of Pharmacology**. V. 172, n. 6, p. 1455-1467, 2014.
- Câmara, D. R.; Guerra, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 32, n. 2, p. 93-99, 2008.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 2013.
- Cerqueira, N. F.; Yoshida, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.
- Chen, J. Q.; Li, Y. S.; Li, Z. J.; Lu, H. X.; Zhu, P. Q.; Li, C. M. Dietary l-arginine supplementation improves semen quality and libido of boars under high ambient temperature. Cambridge University Press (CUP). **Animal**. V.12, n. 08, p. 1611-1620, 2018.
- Chenoweth, P. J.; Chase, C. C. J. R.; Risco, C. A.; Larsen, R. E. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. **Theriogenology**. V. 53, n. 5, p. 1193-1203, 2000.
- Chenoweth, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**. V. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.
- Cho, K. J.; Seo, J. M.; Kim, J. H. Bioactive lipoxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. **Molecules and cells**. V. 32 n. 1, p. 1-5, 2011.
- Codoñer, F.P.; Valls, B.V.; Codoñer, A.A.; Eulalia, A.I. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. **Translational Research**. V. 158, p. 369–84, 2011.
- Couto, G. K.; Britto, L. R. G.; Mill, J. G.; Rossoni, L. V. Enhanced nitric oxide bioavailability in coronary arteries prevents the onset of heart failure in rats with myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. V. 86, p. 110–120, 2015.
- Díaz-Miranda, E. A.; Maitan, P. P.; Machado, T. P.; Camilo, B. S.; Lima, D. A.; Okano, D. S.; Penitente-Filho, J. M.; Machado-Neves, M.; Oliveira, L. L.; Guimarães, S. E. F.; Costa, E. P. da; Guimarães, J. D. Disruption of bovine sperm functions in the presence of aplastic midpiece defect. **Andrology**. P. 1-10, 2019.
- Dieterich, S.; Bielick, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Journal of the American Heart Association**. V. 101, p. 33-39, 2000.
- Duru F. I. O; Olalekan, O. O; Azu, O. O; Okoko I. I. L-arginine augments oxidative stress in cryptorchid testes of adult Sprague-Dawley rats. **Journal of Medicine and Medical Sciences**. V. 2, n. 4, p. 777-782, 2011.

- Estienne, M. J.; Harper, A. F.; Crawford, R. J. Dietary supplementation with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. **Theriogenology**. V. 70, p. 70–76, 2008.
- Ferreira Neto, J. M.; Viana, E.S.; Magalhães, L.M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, p. 279, 1977.
- Ferrusola, C.O.; González Fernández, L.; Macías García, B.; Salazar-Sandoval, C.; Morillo R. A.; Rodríguez- Martínez, H.; Tapia, J.A.; Penã, F.J. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**. V. 81, p. 1106-1111, 2009.
- Förstermann, U.; Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**. V. 33, p. 829–837, 2012.
- FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transcripts through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**. V. 60, p. 300-318, 2005.
- Gruhot, T. R.; Park, S. B.; Popoola, M. A.; Liao S. F.; Mote B. E.; Feugang, J. M. 157 Dietary L-arginine supplementation affects boar seminal plasma proteome. **Reproduction, Fertility and Development**. V. 31, n. 1, p. 203-204, 2019.
- Guerra, M. M. P.; Evans, Gareth; Maxwell, W. M. C. Papel de Oxidantes e anti-oxidantes na Andrologia. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, V. 28, p. 187-195, 2004.
- Guo, H; Gong, Y.; He, B.; Zhao R. Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. **Theriogenology**. V. 87, p.276-283, 2017.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- Hales, D. B; Allen, J. A; Shankara, T; Janus, P; Buck, S; Diemer, T; Hales, K. H. Mitochondrial function in *Leydig* Cell steroidogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 1061, p. 120-134, 2005.
- Hammerstedt, R.H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**. V. 5, p. 675-690, 1993.
- Hancock, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**. V. 76, p. 84-97, 1957.
- 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.

- Hummel, S. G; Fischer, A. J; Martin, S. M; Schafer, Q. F; Buettner, G. R. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 40 p. 501-506, 2006.
- Kim, S.W.; Mateo, R. D.; Yin Y. L.; Wu, G. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. Asian-Australasian, **Journal of Animal Sciences**. Seoul, V.20, p. 295-306, 2007.
- Knox, R. V. The Anatomy & Physiology of Sperm Production in Boars. Universidade de Illinois, Illinois, EUA. 2003. Acessado em 05 de julho de 2019 em: http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig_case/html/library/boara&p.pdf.
- Korpelainen, E. I.; Karkkainen, M. J.; Tenhunen, A.; Lakso, M.; Rauvala, H.; Vierula, M.; Parvinen, M.; Alitalo, K.; Overexpression of VEGF in Testis and Epididymis Causes Infertility in Transgenic Mice: Evidence for Nonendothelial Targets for VEGF. **The Journal of Cell Biology**. V. 143, n. 6, p. 1705-1712, 1998.
- Lampiã, F.; Strijdom, H.; Du Plessis, S. S. Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. **International Journal of Andrology**. V. 29, p. 564-567, 2006.
- Lefèvre, P.L.; Palin, M.F; Murphy, B.D. Polyamines on the reproductive landscape. **Endocrine Reviews**. V. 32, p. 694-712, 2011.
- Lenis, Y. Y; Elmetwally, M. A; Maldonado-Estrada, J. G; Bazer, F. W. Physiological importance of polyamines. **Cambridge University Press. Zygote**. V. 25, n. 3, p.244-255, 2017.
- Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods In Enzymology**. P. 346-357, 1994.
- Li Y.; Wang, A.; Taya, K.; Li, C. Declining semen quality and steadying seminal plasma ions in heat-stressed boar model. **Reproductive Medicine and Biology**. V. 14, p. 171-177, 2015.
- Li, H.; He, H.; Wang, Z.; Cai, J.; Sun, B.; Wu, Q.; Zhang, Y.; Zhou, G.; Yang, L. Rice protein suppresses ROS generation and stimulates antioxidant gene expression via Nrf2 activation in adult rats. **Gene**. V. 585, p.256-264, 2016.
- Liang, M.; Wang, Z.; Li, H.; Cai, L.; Pan, J.; He, H.; Wu, Q.; Tang, Y.; Ma, J.; Yang, L. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. **Food and chemical toxicology**. V. 115, p. 315-328, 2018.
- Liang, M; Ekblad, E; Hellstrand, P; Nilsson, B.O. Polyamine Synthesis Inhibition Attenuates Vascular Smooth Muscle Cell Migration. **Journal of Vascular Research**. V. 41, n. 2, p. 141-147, 2004.

- Liu, Q.; Zhou, Y.; Duan, R.; Wei, H.; Jiang, S.; Peng, J. Lower dietary n-6: n-3 ratio and high-dose vitamin E supplementation improve sperm morphology and oxidative stress in boars. **Reproduction, Fertility and Development**. V. 29, n. 5, p. 940-949, 2017.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 193, p. 265-275, 1951.
- Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular aspects of medicine**. V. 30, p. 42-59, 2009.
- Lu, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. V. 1830, n. 5, p. 3143-3153, 2013.
- Lu, Shelly C. "Regulation of glutathione synthesis." **Molecular aspects of medicine**. V. 30, n. 1-2, p. 42-59, 2009.
- Luo, M.; Tian, R.; Lu, N. Nitric oxide protected against NADPH oxidase-derived superoxide generation in vascular endothelium: Critical role for heme oxygenase-1. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 126, p. 549-554, 2019.
- Martin Rillo, S.; Martinez, E.; Garcia-Artiga, C.; De-Alba, C. Boar semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**. V.31, n.3, p.519-526, 1996.
- Meldrum, D. R; Gambone, C. J; Morris, M. A; Ignarro, L. J. A multifaceted approach to maximize erectile function and vascular health. **Fertility And Sterility**. V. 94, n. 7, p. 2514-2520, 2010.
- Melik, Z.; Zaletel, P.; Virtic, T.; Cankar, K. L-arginine as dietary supplement for improving microvascular function. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**. V. 65, p. 205-217, 2017.
- Mori, H.; Christensen, A. K. Morphometric analysis of *Leydig* cells in the normal rat testis. **Journal of Cell Biology**. V. 84, n.2, p. 340, 1980.
- Naughton, C. H; Nangia, A. K; Agarwal, A. Pathophysiology of Varicoceles in Male Infertility. **Human Reproduction Update**. V. 7, p. 473-481, 2001.
- Nguyen, T.; Nioi, P.; Pickett, C.B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 284, p.13291-13295, 2009.
- Petrovic, V.; Buzadzic, B.; Korac, A.; Vasilijevic, A.; Jankovic, A.; Micunovic, K.; Korac, B. Antioxidative defence alterations in skeletal muscle during prolonged acclimation to cold: role of L-arginine/NO-producing pathway. **Journal of Experimental Biology**. V. 211. p. 114-120, 2008.
- Pons-Rejraji, H.; Sion, B.; Saez, F.; Brugnon, F.; Janny, L.; Grizard, G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**. V.37, p. 529-535, 2009.

- Rajender, S.; Rahul, P.; Mahdi, A. A. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. **Mitochondrion**. V. 10, n. 5, p. 419-428, 2010.
- Said, T. M.; Aziz, N.;, Sharma, R. K.; Lewis-Jones, I.; Thomas, A. J. Jr.; Agarwal, A. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. **Asian Journal of Andrology**. V. 7, n. 2, p.121-126, 2005.
- Samel, S.; Keese, M.; Lanig, S.; Kleczka, M.; Gretz, N.; Hafner, M.; Sturm, J.; Post, S. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. **Shock**. V. 19, n.4, p. 378-382, 2003.
- Sanghamitra, S.; Hazra, J.; Upadhyay, S. N.; Amal, R.C. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. Indian. **Journal Physiology Pharmacology**. V. 52, p. 84-90, 2008.
- Souza, A. C. F.; Marchesi, S. C.; Domingues de Almeida Lima, G.; Ferraz, R. P.; Santos, F. C.; Matta, S. L. P.; Machado-Neves, M. Effects of Sodium Arsenite and Arsenate in Testicular Histomorphometry and Antioxidants Enzymes Activities in Rats. **Biological Trace Element Research**. V. 171, n. 2, p. 354-362, 2015.
- Souza, A. C. F.; Marchesi, S. C.; Domingues de Almeida Lima, G.; Ferraz, R. P.; Santos, F. C.; Matta, S. L. P.; Machado-Neves, M. Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. **Biological Trace Element Research**. V. 171, p. 354-362, 2016.
- Srivastava, S.; Agarwal, A. Effect of anion channel blockers on L-arginine action in spermatozoa from asthenospermic men. **Andrologia** V. 42, p. 76-82, 2010.
- Srivastava, S.; Desai, P.; Couthinho, E.; Govil, G. Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. **Physiological Chemistry and Physics and Medical N.M.R.** V. 32, p. 127-135, 2000.
- Srivastava, S.; Prashant, D.; Coutinho, E.; Govil, G.; Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. **Biology of Reproduction**. V. 74, p. 954-958, 2006.
- Stone, B. A. Heat induced infertility of boars: The inter-relationship between depressed sperm output and fertility and an estimation of the critical air temperature above which sperm output is impaired. **Animal Reproduction Science**. V. 4, n. 4, p. 283–299, 1982.
- Suriyasomboon, A.; Lundeheim, N.; Kunavongkrit, A.; Einarsson, S. Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars, under different housing systems in Thailand. **Livestock Production Science**. V. 89, p. 19-31, 2004.
- Toniolli, R.; Costa E Moreira, F. R.; Chaves, R. N.; Aires, F. P.; Ferreira, J. L.; Silva, M. C. Efeito da incubação e temperatura de diluição sobre o sêmen suíno *in natura*. **Revista Ciência Animal**. V. 15, p. 99-105, 2005.

- Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of Research. **Journal of Chromatography B**. V. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.
- Valença, R. M. B.; Silva Junior, V. A.; Araújo, L. P. C.; Reis, J. C.; Guerra, M. M. P.; Soares, P. C.; Costa, A. N. Morphometry and histomorphometry of the testis in crossbred pigs fed diets with different protein levels. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 65, n. 5, p.1329-1338, 2013.
- Weis, S.M; Cheresch, D.A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nature Medicine**. V. 17, p. 1359-1370, 2011.
- Weller, M.M.D.C.A.; Alebrante, L.; Campos, P.H.R.F. et al. Effect of heat stress and feeding phosphorus levels on pig electron transport chain gene expression. **Animal**. P. 1-9, 2013.
- Wu, G.; Morris, S. M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond Guoyao. **Biochemistry Journal**. V. 336, p.47-53, 2007.
- Wu, X.; Yin, Y. L.; Liu, Y. Q.; Liu, X. D.; Liu, Z. Q.; Li, T. J.; Huang, R. L.; Ruan, Z.; Deng, Z. Y. Effect of dietary arginine and N-carbamoylglutamate supplementation on reproduction and gene expression of eNOS, VEGFA and PlGF1 in placenta in late pregnancy of sows. **Animal Reproduction Science**. V. 132, 187-192, 2012.

Tabela 1. Composição das rações experimentais (Porcentagem na matéria natural)

Ingredientes, %	CONTROLE	ARGININA
Milho 7,88%	58,600	58,600
Farelo de soja 45,0%	16,500	16,500
Farelo de trigo	18,000	18,000
Óleo de soja	2,300	2,300
Caulim	1,000	-
L-arginina	-	1,000
Fosfato bicálcico	1,730	1,730
Calcário Calcítico	0,780	0,780
Sal comum	0,585	0,585
L-lisina 78,0%	0,120	0,120
Adsorvente ¹	0,100	0,100
Mistura mineral ²	0,100	0,100
Cloreto de colina	0,100	0,100
Mistura vitamínica ³	0,050	0,050
Tiamulina ⁴	0,020	0,020
Tilosina ⁵	0,015	0,015
Composição nutricional calculada ⁶		
Arginina digestível, %	0,893	1,824
Cálcio, %	0,800	0,800
Energia metabolizável, kcal/kg	3100	3100
Fibra Bruta, %	3,600	3,600
Fósforo disponível, %	0,400	0,400
Lisina digestível, %	0,700	0,700
Metionina + cisteína digestível, %	0,444	0,444
Proteína bruta, %	15,00	15,35
Sódio, %	0,250	0,250
Treonina digestível, %	0,475	0,475
Triptofano digestível, %	0,156	0,156

¹250 g Adsorvente a base de algas/kg (Mycosorb, Alltech, Lexington, Kentucky, EUA).

²Conteúdo por quilo do produto: Cu como sulfato de Cobre (19,50 g); Fe como sulfato de Ferro (65,00 g); I como iodato de cálcio (1300,0 mg); Mn como sulfato de manganês (42,0 g); Zn como óxido de zinco (104,0 g) (Premix mineral, Supermix nutrição animal, Ponte Nova, MG, Brasil).

³Conteúdo por quilo do produto: Ácido Fólico (250,00 mg); Pantotenato de Cálcio (5.000,00 mg); Biotina (37,50 mg); Niacina (8.750,00 mg); Vitamina B6 (500,00 mg); Vitamina B2 (1.500,00 mg); Selênio (75,00 mg); Vitamina B1 (500,00 mg); Vitamina A (2.000,000 U.I.); Vitamina B 12 (7.500,00 mcg); Vitamina D3 (370,000 U.I.); Vitamina E (6.250 U.I.); Vitamina K3 (750,00 mg) (Premix vitamínico, Supermix nutrição animal, Ponte Nova, MG, Brasil).

⁴200 g Fumarato de hidrogênio de tiamulina/kg (Pulmolín, Farmabase, Jaguariuna, SP, Brasil).

⁵250 g tilosina/kg (Tylan G250, Elanco, São Paulo, SP, Brasil).

Tabela 2. Descrição dos *primers*

Gene	Sequência	Número de acesso
<i>GSH-PX</i>	F: AATTGCCTCAAGTACGTCCGA R: CATTGCGCCATTCACCTCAA	NM_214201.1
<i>NADPH-OX</i>	F: GTTGGTCCACGATCCAAAG R: CCAGCCTCTCACACAGATA	NM_214043.2
<i>SOD1</i>	F: TGCAGGTCCCTCACTTCAATC R: CTTTGCCAGCAGTCACATTG	AF396674.1
<i>SOD2</i>	F: ACGGTGGAGGCCACATCAATCA R: AAAGTCGCGTTTGATGGCTTCC	NM_214127.2
<i>ACTB</i>	F:CTTCTAGGCGGACTGTTAGTG R:AGCCATGCCAATCTCATCTC	XM_0031242803
<i>HPRT1</i>	F:CCAGTCAACGGGCGATATAA R:GACCAAGGAAAGCAAGGTTG	NM_001032376.2
<i>GAPDH</i>	F:CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R:AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT	NM_001206359.1

GSH-PX: Glutathione Peroxidase, *NADPH-OX*: NADPH oxidase, *SOD1*: Superóxido Dismutase 1, *SOD2*: Superóxido Dismutase 2, *ACTB*: B-actin, *HPRT1*: Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase 1, *GAPDH*: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

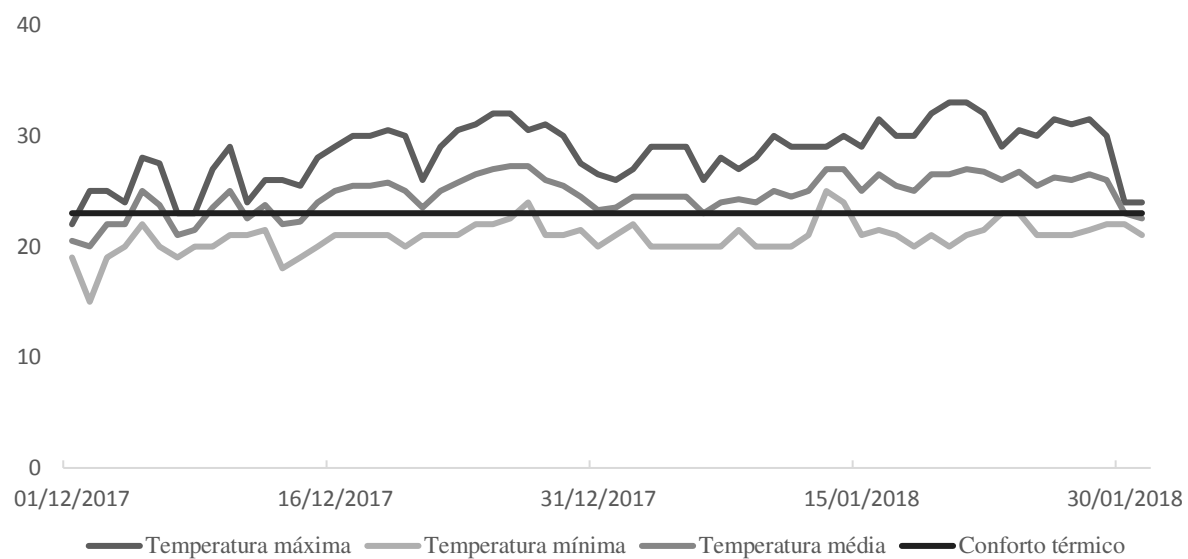


Figura 1. Temperatura experimental durante o período de 60 dias. O eixo Y representa a temperatura em ° C e o eixo X o período experimental

Tabela 3. Variáveis morfológicas do sêmen fresco de varrões suplementados ou não com L-arginina

Item	CONTROLE	ARGININA	<i>P</i> -valor
Defeitos maiores (%)	9,67 ± 5,11	8,69 ± 2,29	0,851
Defeitos menores (%)	10,58 ± 2,73	6,62 ± 0,76	0,139
Defeitos totais (%)	20,25 ± 7,18	15,31 ± 2,46	0,479

Tabela 4. Características do sêmen resfriado de varrões suplementados ou não com L-arginina de acordo com o dia de coleta

Período	CONTROLE	ARGININA	Média	<i>P</i> -valor		
				Ta	P	TaxP
Motilidade (%)						
45° dia	69,28 ± 4,14	68,13 ± 2,48	68,70 ± 3,31	0,971	0,241	0,809
52° dia	65,00 ± 3,93	63,75 ± 2,63	64,37 ± 3,28			
59° dia	67,86 ± 2,40	70,00 ± 1,88	68,93 ± 2,14			
Média	67,38 ± 3,46	67,29 ± 2,44				
Vigor						
45° dia	2,85 ± 0,53	3,06 ± 0,54	2,96 ± 0,54	0,258	0,483	0,875
52° dia	3,07 ± 0,61	3,12 ± 0,53	3,09 ± 0,56			
59° dia	3,07 ± 0,60	3,18 ± 0,54	3,12 ± 0,57			
Média	3,00 ± 0,55	3,12 ± 0,52				

Ta = *P*-valor do tratamento, P = *P*-valor período, TaxP = *P*-valor da interação tratamento com período.

Tabela 5. Capacidade antioxidante, perfil oxidativo e relação nitrito/nitrato no tecido testicular de varrões suplementados ou não com L-arginina.

Item	CONTROLE	ARGININA	<i>P</i> -valor
SOD (U/mg)	2,08 ± 0,16	1,79 ± 0,14	0,196
GST (μmol/g)	38,00 ± 4,83	34,17 ± 4,63	0,576
CAT (U/mg)	6,18 ± 0,66	5,49 ± 0,54	0,432
MDA (μM/mg)	2,18 ± 0,33	2,86 ± 0,33	0,171
PC (nmol/mg)	15,20 ± 1,13	12,30 ± 1,76	0,186
Nitrito/nitrato (μmol/L)	6,58 ± 0,38	6,35 ± 0,31	0,653

Tabela 6. Características histomorfológicas do tecido testicular de varrões suplementados ou não com L-arginina

Parâmetros	CONTROLE	ARGININA	P-valor
Túbulo (%)	54,56 ± 2,75	52,53 ± 1,96	0,559
Epitélio (%)	31,68 ± 2,27	30,55 ± 1,04	0,659
Túnica Própria (%)	6,54 ± 0,35	5,788 ± 0,31	0,129
Lúmen (%)	16,34 ± 0,86	16,20 ± 1,43	0,933
Diâmetro Tubular (µm)	254,50 ± 7,01	239,90 ± 9,65	0,243
Altura do Epitélio (µm)	68,11 ± 1,55	64,05 ± 3,79	0,336
Intertúbulo (%)	45,44 ± 2,75	47,47 ± 1,96	0,559
Células de <i>Leydig</i> (%)	75 ± 1,87	75,3 ± 1,20	0,895
Vasos sanguíneos (%)	7,49 ± 0,83	14,69 ± 1,58	0,001
Núcleo células de <i>Leydig</i> (%)	10,94 ± 0,95	14,05 ± 1,05	0,044
Citoplasma células de <i>Leydig</i> (%)	64,06 ± 1,57	61,25 ± 1,73	0,250
Tecido conectivo (%)	16,50 ± 1,98	8,90 ± 0,52	0,002
Estereologia da célula de <i>Leydig</i>			
Volume da célula (µm ³)	1271 ± 95,2	987 ± 114,49	0,078
Volume do Núcleo (µm ³)	179,6 ± 11,05	175,4 ± 12,47	0,806
Volume do citoplasma (µm ³)	1091 ± 90,25	811,7 ± 104,65	0,063

Tabela 7. Expressão gênica de enzimas antioxidantes e pró-oxidantes no tecido testicular de varrões

Item	CONTROLE	ARGININA	EPM	P-valor
<i>GSH-PX</i>	1,02	0,92	0,04	0,144
<i>SOD1</i>	0,93	0,95	0,05	0,841
<i>SOD2</i>	1,62	1,34	0,15	0,239
<i>NADPH-OX</i>	1,66 a	1,36 b	0,06	0,004

EPM = erro padrão da média.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
 CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 21 de Dez. de 2017

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Suplementação da ração com l-arginina e seus efeitos na capacidade antioxidante e na qualidade espermática de suínos", protocolo nº 069/2017, sob a responsabilidade de Alysson Saraiva - 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 nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de 20 de Dez. de 2017.

Finalidade: Pesquisa Ensino

Vigência do Projeto: de 21 de Dez. de 2017 a 05 de Mar. de 2018

Espécie/linhagem: Suíno (*Sus scrofa domesticus*) Nº de animais: 14

Peso: 220 Kg Idade: 11 meses Sexo: Macho Origem: Setor de Suinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "Dietary L-arginine supplementation and its effects on antioxidant capacity and sperm quality of boars", protocol nº 069/2017, under the responsibility of Alysson Saraiva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on Dec, 20th, 2017.

Finality: Research Education

Duration of the Project: from Dec, 21th, 2017 to Mar, 05th, 2018.

Species / strain: Swine (*Sus scrofa domesticus*) Nº of animals: 14

Weight: 220 Kg Age: 11 months Sex: Male Source: Setor de Suinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

Luciana Navajas Rennó
 Coordenadora da CEUAP/UFV