

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO NA QUALIDADE DE DOSES DE
SÊMEN SUÍNO EM DIFERENTES DILUENTES DE CONSERVAÇÃO

Autor: Luiza Pommerehn

PORTO ALEGRE

2015/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO NA QUALIDADE DE DOSES DE
SÊMEN SUÍNO EM DIFERENTES DILUENTES DE CONSERVAÇÃO**

Autor: Luiza Pommerehn

Orientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo

Coorientador: Ana Paula Gonçalves Mellagi

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para a obtenção de
Graduação em Medicina Veterinária**

PORTO ALEGRE

2015/1

RESUMO

O presente experimento consistiu em avaliar a influência da frequência de agitação (homogeneização) de doses inseminantes (DI) durante o período de armazenamento. No estudo, foram analisados sete ejaculados de diferentes machos. Os ejaculados foram diluídos *split sample* em dois diluentes: BTS (curta duração) e em Androstar[®] Plus (longa duração). Após o período de estabilização a 22°C (0h), as doses foram armazenadas em conservadora (17,8°C) e distribuídas igualmente em dois tratamentos: T1, em que a homogeneização foi feita manualmente, uma vez ao dia; e T2, em que a homogeneização foi feita mecanicamente pela conservadora de sêmen quatro vezes ao dia por dois minutos. A motilidade foi analisada nas horas 24, 72, 120 e 168, através do sistema computadorizado CASA (AndroVision). O percentual de defeitos de acrossoma foi avaliado nos momentos 72h e 168h. Não foram encontradas diferenças estatísticas na qualidade das DI entre os grupos de homogeneização, entretanto ficou evidenciada a diferença entre os diluentes. Nos padrões avaliados foi observada uma superioridade do diluente de longa ação quando comparado ao diluente de curta ação.

Palavras-chave: armazenamento, dose inseminante, homogeneização, sedimentação.

ABSTRACT

The present experiment aimed to evaluate the influence of agitation frequency (homogenization) of insemination doses (ID) during storage. Seven ejaculates from different boars were used and diluted in split sample into two extenders: BTS (short-term duration) and Androstar[®] Plus (long-term duration). After the stabilization of nearby 22°C (0h), the ID were stored in a temperature-controlled storage unit (17,8°C) and equally distributed in two treatments: T1, manual homogenization once a day, and T2, automatic homogenization four times a day for two minutes. Motility was assessed at 24, 72, 120 and 168 h by computerized system CASA (AndroVision). The percentage of acrosome defects was evaluated at 72 h and 168 h. No statistical differences were found in semen doses quality between the homogenization group, however the difference was demonstrated between the extenders. According to the variables analyzed, a superiority of long-term extender was observed when compared to short-term extender.

Keywords: homogenization, liquid-stored semen, sedimentation, storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura1 – Motilidade total de espermatozoides suínos ao longo do armazenamento em função do diluente e tratamento	21
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Integridade de acrossoma, motilidade progressiva e cinética espermática de doses de sêmen de acordo com o tempo de armazenamento, diluente e tratamento24

LISTA DE ABREVIATURAS

µm - Micrômetro

°C - Graus Celsius

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - Frequência de batimento de cauda

BSA - Albumina sérica bovina

BTS - Beltsville Thawing Solution

CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis

CO₂ - Dióxido de Carbono

CPS - Central de Processamento de Sêmen

DAP - Deslocamento médio

DCL - Deslocamento curvilíneo

DI - Doses inseminantes

DSL - Deslocamento linear

HEPES - *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2ethanesulfonic acid*

Hz - Hertz

IA - Inseminação artificial

LIN - Linearidade

pH - Potencial Hidrogeniônico

STR - Retilíneo

VAP - Velocidade média percorrida

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade em linha reta

WOB - Coeficiente de oscilação

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família pelo apoio incondicional. A minha mãe Odete, por ser meu exemplo de determinação e persistência. Obrigada por nunca medir esforços para que eu realize meus sonhos e alcance meus objetivos. Obrigada por ser essa mulher que tanto admiro. Ao meu pai Ricardo, por acreditar e respeitar minhas escolhas estando sempre ao meu lado. Ao meu irmão Leonardo por torcer pelo meu sucesso.

Aos professores do Setor de Suínos pelos quatro anos de muito aprendizado e contribuição para minha formação profissional. Obrigada por todos ensinamentos, é gratificante aprender com profissionais que tanto admiro. Ao meu orientador Fernando P. Bortolozzo, em especial, pela possibilidade de realizar esse trabalho.

Aos colegas do Setor de Suínos por toda amizade e por compartilhar momentos inesquecíveis ao longo desses anos. Em especial, Karine (minha eterna orientadora), Maria Clara, Evandro, Sato, Rafa Ulguim, Carol Malgarin, Diogo Magnabosco, Felipe Betiolo, Thaís e todos os demais “vida louca”.

As minhas amigas do coração da Veterinária Júlia Moroni, Carolzinha, Carine, Xanxerê e Malu por todos os momentos juntas. Obrigada pela amizade que construímos!

A minha coorientadora Ana Paula Mellagi por todo auxílio e dedicação para a elaboração de um bom trabalho.

A minha “segunda coorientadora”, e não menos importante, Mariana Menegat pela especial dedicação e companheirismo tanto na execução quanto na correção do trabalho. Obrigada por toda disponibilidade, incentivo e profissionalismo.

Aos meus amigos por entenderem minha ausência pela dedicação ao curso em diversos momentos. Em especial, Camila Bergesch, Ana Rieck, Letícia Langeloh, Carol Rech, Mozart, Kamila Santos, Lise e Ane Rech. O apoio e compreensão de vocês foi fundamental!

Enfim, gostaria de agradecer a todos que acompanharam a minha trajetória ao longo do Curso de Medicina Veterinária. A conclusão dessa etapa é a realização de um sonho!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1	Inseminação Artificial.....	10
2.2	Avaliação Espermática.....	11
2.2.1	Motilidade Espermática.....	11
2.2.2	Concentração Espermática.....	12
2.2.3	Sistema CASA.....	12
2.2.4	Morfologia Espermática.....	13
2.3	Armazenamento de Doses Inseminantes.....	15
2.3.1	Tempo e Temperatura de Armazenamento.....	15
2.3.2	Efeito da Homogeneização.....	17
3	INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO NA QUALIDADE DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO.....	18
3.1	Introdução.....	18
3.2	Materiais e Métodos.....	19
3.3	Resultados e Discussão.....	20
3.4	Conclusão.....	23
3.5	Considerações Finais.....	25
4	REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

A implementação da inseminação artificial (IA) na espécie suína proporcionou benefícios através da difusão rápida de características desejáveis no rebanho, aproveitamento de machos geneticamente superiores e redução dos custos de produção (BORTOLOZZO et al., 2005a). Para a otimização desses resultados a análise de fatores relacionados à qualidade do sêmen tornou-se essencial, assim como o desenvolvimento de novas tecnologias, visando padronizar a técnica de IA (BROEKHUIJSE et al., 2011a).

A IA em fêmeas suínas caracteriza-se pela utilização de doses inseminantes (DI) resfriadas e mantidas a 15-18°C (JOHNSON et al., 2000) durante três a dez dias, dependendo do diluente utilizado (SCHULZE et al., 2013). Portanto, é necessário a elaboração de padrões de qualidade para o processamento e armazenamento das DI em tais condições, uma vez que esses fatores estão diretamente relacionados com a fertilidade e desempenho reprodutivo do plantel (BELSTRA, 2007).

Apesar dos benefícios proporcionados pela implementação da IA, algumas granjas apresentam desempenho reprodutivo abaixo do potencial esperado (BORTOLOZZO et al., 2005a). Uma razão consiste no processamento e armazenamento inadequados das DI utilizadas para a IA. As células espermáticas das DI são submetidas à diluição, mudança de microambiente, resfriamento e envelhecimento durante o armazenamento antes da IA. Um dos fatores que influencia a função espermática ao longo desses processos são as condições do meio com o diluente. Todavia, a sedimentação das células espermáticas durante o armazenamento pode ser um fator, também, capaz de modificar a qualidade das DI, uma vez que parece alterar a disponibilidade de diluente para alguns espermatozoides e comprometer a sobrevivência dos mesmos (BELSTRA, 2007).

Atualmente, existem estudos que demonstram o efeito da sedimentação na qualidade das DI no período de armazenamento, entretanto os resultados são contraditórios. O desenvolvimento de novas pesquisas com foco na sedimentação espermática em DI de suínos pode determinar a elaboração de métodos de utilidade técnica que visem promover a qualidade espermática durante o armazenamento.

O trabalho de conclusão de curso consistiu em avaliar a influência da frequência de agitação (homogeneização) de doses de sêmen suíno durante o período de armazenamento, através da análise da qualidade dessas DI pela utilização de um sistema de análise computadorizada de sêmen. O estudo comparou a prática recomendada para a conservação das

DI, que consiste na homogeneização manual das DI uma vez ao dia, e a utilização de uma conservadora de sêmen com homogeneização automática das DI. O projeto tem como objetivo encontrar respostas que possam auxiliar na elaboração de estratégias com aplicabilidade prática referente à frequência ideal de agitação de doses de sêmen suíno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminação Artificial

Devido à alta competitividade do sistema de produção de suínos, novas técnicas buscando melhores resultados nos desempenhos reprodutivos e redução de custos vem sendo incorporadas com o intuito de atender às exigências de mercado. Através da expressão de um melhor potencial genético dos animais, a técnica de IA se consolidou e possibilitou uma importante mudança no panorama mundial da suinocultura (ROCA et al., 2011), sendo hoje a técnica reprodutiva mais empregada por ser adotada em mais de 90% das granjas tecnificadas (ROCA et al., 2006).

A IA apresenta uma série de benefícios em relação à monta natural, como maior segurança sanitária, descarte de ejaculados impróprios para o uso, cuidados higiênicos maiores, melhor aproveitamento de reprodutores e oportunidade de evolução técnica da equipe para a realização da prática (BORTOLOZZO et al., 2005a). Além disso, há a possibilidade de melhoramento genético nos plantéis, pela utilização de reprodutores geneticamente superiores (ROCA et al., 2006). O uso potencializado desses reprodutores possibilita agregar características desejáveis de carcaça aos animais que irão para o abate, como maior ganho de peso e maior rendimento de carne, ocasionando uma padronização da carcaça (BENNEMANN, 2006).

O desenvolvimento de estratégias para o processamento de sêmen e produção de DI surgiu paralelamente à difusão da IA na busca da eficácia da técnica e resultados reprodutivos satisfatórios (GADEA, 2003). As DI processadas e acondicionadas de forma não adequada podem comprometer o desempenho reprodutivo de um plantel (BELSTRA, 2007). Outro fator é o aumento exponencial nas últimas décadas da utilização de sêmen resfriado (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013), demonstrando a necessidade das Centrais de Processamento de Sêmen (CPS) em melhorar a qualidade das DI e estabelecer um padrão de produção de DI de alta qualidade, biossegurança e alto valor genético para alcançar os resultados reprodutivos desejados (WABERSKI, 2009).

2.2 Avaliação Espermática

A análise do sêmen é fundamental, visto que a qualidade do sêmen está relacionada com o potencial de fertilidade do reprodutor. A avaliação das características seminais tem justamente o objetivo de certificar a qualidade espermática com o intuito de produzir DI de qualidade (FLOWERS, 2013). Desta forma, os ejaculados são submetidos a um exame espermático convencional após as coletas, onde é mensurado o volume do ejaculado e feitas análises microscópicas através da avaliação da concentração espermática e do percentual de espermatozoides móveis (GADEA, 2005), sendo estabelecido um critério mínimo para que esse possa ser utilizado na produção de DI: motilidade acima de 70% e até 20% de alterações morfológicas (FLOWERS, 2013). Além da mensuração do volume do ejaculado, outras análises macroscópicas são avaliadas como o aspecto, a cor e o odor (BORTOLOZZO et al., 2005b).

2.2.1 Motilidade Espermática

Dos exames realizados na rotina de uma CPS no ejaculado, o parâmetro de avaliação mais frequente é a análise da motilidade espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003). A mesma está correlacionada com a viabilidade espermática e avalia o percentual de espermatozoides que estão em movimento (BROEKHUIJSE et al., 2011a).

A análise da motilidade é feita em duas etapas. Em um primeiro momento, após a coleta, para saber se o sêmen é ou não apropriado para elaboração de DI (motilidade mínima de 70%), e, posteriormente, após a diluição, para saber se os padrões de motilidade continuam satisfatórios (BORTOLOZZO et al., 2005b). É importante que não haja diferença maior de 10% entre a motilidade do sêmen *in natura* e pós-diluído para a utilização na produção de DI (FLOWERS, 1997). O método de avaliação pode ser feito pela observação subjetiva através do auxílio de um microscópio ou por um sistema computadorizado (*Computer-Assisted Sperm Analysis – CASA*), responsável por análises objetivas (FOX-CROFT et al., 2008).

É sabido que ejaculados *in natura* que apresentam motilidade superior a 60% não produzem variações no tamanho da leitegada (FLOWERS, 1997). Os parâmetros de motilidade, avaliados pelo sistema CASA, estão relacionados com a capacidade de fertilização dos ejaculados, uma vez que podem influenciar tanto na taxa de parto quanto no tamanho da leitegada. A motilidade progressiva apresenta um efeito positivo significativo em relação à taxa

de parto, enquanto a motilidade total em relação ao número de nascidos (BROEKHUIJSE, 2011b).

2.2.1 Concentração Espermática

A definição da análise de concentração espermática é o número de células espermáticas presentes em um ejaculado, por sua unidade de volume (CORRÊA et al., 2001). A concentração espermática pode ser avaliada tanto de forma direta quanto de forma indireta, dependendo do método utilizado para avaliação. A contagem de forma direta dos espermatozoides é feita por meio da câmara hemocitométrica e contagem eletrônica de partículas, enquanto a contagem de forma indireta ocorre por estimativa, através do espectrofotômetro e do espermodensímetro de Karras. A escolha do método de avaliação da concentração espermática depende de cada CPS (BORTOLOZZO et al., 2005b), sendo o método direto da câmara hemocitométrica considerado o padrão-ouro para a análise (HANSEN et al., 2006). Entretanto, o uso do espectrofotômetro é mais observado, devido à menor demanda e tempo de trabalho quando comparado com a técnica padrão-ouro, tendo como desvantagem a ocorrência de superestimação da concentração espermática. Tanto a superestimação quanto a subestimação da concentração espermática podem levar a problemas reprodutivos, e também ao aumento do custo de produção devido a essa alteração de número de espermatozoides nas DI. Doses com baixa quantidade de espermatozoides podem resultar em uma taxa de fecundação abaixo da desejada, assim como DI com excesso de células espermáticas indicam a não potencialização do uso de reprodutores de alto valor genético (VIANNA et al., 2004). Por conseguinte, é importante ressaltar que nos últimos anos houve um aumento no número de métodos precisos utilizados, como a contagem eletrônica através do sistema CASA, melhorando a qualidade das DI (HANSEN et al., 2006).

2.2.2 Sistema CASA

O sistema de análise de sêmen computadorizado - CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*) - otimiza o exame do ejaculado e aumenta a acurácia na análise das características seminais, como motilidade e concentração espermática, e ainda pode disponibilizar recursos capazes de avaliar a morfometria, a viabilidade e a morfologia espermática (AMMAN & WABERSKI, 2014). O sistema CASA é formado por um microscópio com contraste de fase associado a um computador (DIDION, 2008), sendo um sistema informatizado que visualiza e digitaliza a imagem do movimento da célula espermática e no qual a exata trajetória de cada

célula espermática pode ser acompanhada e gravada para análise. As informações sobre a cinética das células de forma individual e as estatísticas referentes ao resumo do ejaculado podem ser calculados a partir de dados coletados pelo sistema CASA (VERSTEGEN et al., 2002).

Os parâmetros analisados podem ser relacionados com a fertilidade dos reprodutores (BROEKHUIJSE et al., 2011b), pois através do sistema CASA é possível garantir uma avaliação mais detalhada e precisa da motilidade espermática, o que devido à sua precisão aumenta a probabilidade de diagnosticar mudanças na motilidade em relação ao sucesso da fecundação dos oócitos (BROEKHUIJSE et al., 2011a).

A motilidade é mensurada pelo sistema através da análise dos parâmetros de deslocamento dos espermatozoides. Estes são subdivididos de acordo com a direção do movimento, podendo ser curvilíneo ou retilíneo. Na subdivisão avalia-se variáveis como: DCL (deslocamento curvilíneo, μm), DSL (deslocamento linear, μm), DAP (deslocamento médio, μm), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao trajeto médio, μm), LIN (linearidade do trajeto curvilíneo, VSL/VCL), STR (retilinearidade do trajeto médio, VSL/VAP), BCF (frequência com que o trajeto curvilíneo cruza o trajeto médio, Hz), WOB (Wobble, medida de oscilação do trajeto curvilíneo sobre o trajeto médio, VAP/VCL) (AMMAN; WABERSKI, 2014). A motilidade progressiva é um indicador de metabolismo e membrana intactos, sendo, portanto, essencial o controle de qualidade diário da motilidade (JOHNSON, 2000).

O sistema CASA caracteriza-se por eliminar a subjetividade da avaliação espermática e por proporcionar uma padronização da análise. Todavia, a utilização desse tipo de tecnologia exige a evolução técnica da equipe de funcionários, além do alto custo de investimento para a compra do sistema e dos materiais de consumo (AMMAN ; WABERSKI, 2014).

2.2.3 Morfologia

A técnica de morfologia consiste na análise da frequência de anormalidades espermáticas e o percentual total dessas alterações em uma amostra de sêmen suíno, sendo uma avaliação qualitativa das células espermáticas (BERNARDI, 2008). O objetivo é analisar se as células espermáticas se desenvolveram e maturaram corretamente, mantendo a capacidade de fertilização (GADEA, 2002). Para a realização do exame de morfologia é necessária mão de obra treinada e capacitada para a identificação de alterações espermáticas. O exame pode ser

realizado no microscópio de contraste de fase, com o aumento de 1000x e óleo de imersão, onde são analisadas e contadas no mínimo 200 células espermáticas por amostra. Outro método seria através do esfregaço fino em lâmina com uso de corante, onde a avaliação é efetuada em microscópio óptico de campo claro com aumento mínimo, também, de 1000x (BORTOLOZZO et al., 2005b).

No exame são avaliadas alterações de cabeça, colo, peça intermediária e cauda, totalizando no máximo 20% de anormalidades morfológicas na amostra (BORTOLOZZO et al., 2005b). Para Rodríguez-Martinez ; Eriksson (2000), é considerado aceitável que as anormalidades de cabeça não ultrapassem 10% e que nenhum outro defeito ultrapasse 5% individualmente. As anormalidades espermáticas podem ser classificadas em primárias (de origem intragonadal, indicativas de problemas na espermatogênese), secundárias (de origem extragonadal indicativas de disfunção epididimária) e terciárias (de origem exógena, advindas da manipulação pós-ejaculação). As anormalidades primárias se subdividem em específicas (raras e quase sempre de origem genética) e não específicas, e podem afetar qualquer porção do espermatozoide (cabeça, colo, peça intermediária e cauda) não podendo sempre ser diferenciadas das anormalidades secundárias. As anormalidades secundárias têm origem primeiramente no epidídimo onde os defeitos observados são: cabeça destacada, cauda dobrada ou em forma de chave, e anormalidades da peça intermediária ou cauda. Já as anormalidades terciárias, nem sempre são diferenciadas das secundárias. Acrossoma danificado, em destacamento e ausente, ruptura de colo e de peça intermediária, cauda dobrada e cabeça destacada, podem ser defeitos de origem terciária (BORTOLOZZO et al., 2005b).

Um percentual alto de defeitos morfológicos pode estar associado a alterações causadas por problemas durante o processo de espermatogênese, na maturação no epidídimo, ou ainda por problemas de manipulação incorreta do ejaculado na sala de coleta e/ou laboratório (BORTOLOZZO et al., 2005b). As alterações morfológicas mais comuns são observadas na cauda e gota citoplasmática, todavia são as alterações de cabeça (tamanho e formato) as mais raras e também severas, pois esse tipo de alteração limita a ligação entre o espermatozoide e o oócito para que ocorra a fecundação (FLOWERS, 2004a).

A avaliação de acrossoma pode ser efetuada após a coleta do sêmen, como as outras alterações, ou após teste de resistência osmótica, que consiste em determinar o percentual de acrossomas intactos após incubação em meio hiposmótico. A função acrossômica desempenha um papel chave dentro dos eventos da fertilização. A integridade do acrossoma é fundamental para a fecundação (GADEA, 1998), pois espera-se que qualquer degeneração, má formação ou

dano ao acrossoma elimine a chance da célula espermática de fecundar o oócito. Desta forma, o percentual de células espermáticas com acrossoma sem alterações é considerado um parâmetro seminal importante. As alterações de acrossoma são observadas na morfologia de três diferentes formas: danificado, em destacamento e ausente (FLOWERS, 2004a), aparecendo em percentuais de 1 a 2% em suínos e com origem secundária ou terciária. As anormalidades de acrossoma acontecem principalmente por fatores de envelhecimento, rápida queda de temperatura, congelamento e descongelamento, sugerindo que as causas são de natureza exógena (BORTOLOZZO et al., 2005b).

2.3 Armazenamento de Doses Inseminantes

Posteriormente à avaliação espermática, no caso do ejaculado estar entre os padrões pré-estabelecidos exigidos (percentual de motilidade mínimo de 70% e até 20% de alterações morfológicas) (FLOWERS, 2013), inicia-se o processo de produção e armazenamento de DI (FERREIRA et al., 2005). Conforme citado anteriormente, as DI são armazenadas a uma temperatura entre 15-18°C por um período de três a dez dias antes do uso na IA. Esse período varia de acordo com o diluente utilizado.

2.3.1 Tempo e Temperatura de Armazenamento

Tanto o tempo quanto o diluente utilizado são fatores que podem interferir na qualidade de armazenamento de DI. O diluente aplicado na produção de DI tem como função permitir que o espermatozoide se mantenha viável durante um determinado período, estabelecendo um intervalo de tempo ideal para a utilização da DI na IA (JOHNSON et al., 2000). Esse período de viabilidade espermática permite que o espermatozoide, no momento da IA, fecunde o oócito e assim, se obtenha resultados satisfatórios de fertilidade (RIESENBECK, 2011). Os diluentes contêm nutrientes para o metabolismo dos espermatozoides, são capazes de neutralizar resíduos metabólicos, mantêm o equilíbrio osmótico e de pH, estabilizam a membrana plasmática, previnem a capacitação do espermatozoide e retardam o crescimento bacteriano (FLOWERS, 2004b). Todavia, mesmo com a ação do diluente, com o passar do tempo a capacidade de fecundação dos espermatozoides pode reduzir como consequência do envelhecimento celular. Isso acontece pela existência de uma correlação negativa entre a idade do espermatozoide e a sua capacidade de fecundação. Portanto, de acordo com as condições e com o período de

armazenamento os espermatozoides irão sofrer mudanças funcionais e estruturais correspondentes ao envelhecimento celular (WABERSKI et al., 1994).

Os diluentes são classificados de acordo com tempo que são capazes de manter a motilidade espermática acima de 70%, desta forma classificam-se em diluentes de curta ação, diluentes de média ação e diluentes de longa ação. Os de curta ação mantêm a motilidade acima de 70% por até três dias (AMBROGI et al., 2006) e apresentam como vantagem o baixo custo de produção e comercialização (LEVIS, 2000), enquanto os diluentes de média e longa ação mantêm a motilidade de 70% durante um período maior, de cinco ou sete a dez dias (AMBROGI et al., 2006). Um dos principais diluentes de curta ação é o BTS, sendo um dos mais utilizados devido à sua facilidade de fabricação e baixo custo (LEVIS, 2000). Os diluentes de média e longa ação apresentam em sua composição estabilizantes de membrana, como o BSA, que estimulam a motilidade, HEPES capazes de tolerar maiores flutuações de pH e outros componentes que prolongam a viabilidade espermática, aumentando, conseqüentemente, o custo do produto em relação aos diluentes de curta ação (JOHNSON, 2000).

A baixa temperatura de armazenamento do sêmen suíno (15-18°C) tem como objetivo desacelerar os processos metabólicos promovendo um menor consumo de energia pelo espermatozoide, buscando prolongar a viabilidade e diminuir possíveis danos (WEITZE, 2012). Entretanto, o sêmen suíno apresenta alta suscetibilidade às condições adversas de temperatura (SCHULZE, 2013) e suas variações podem afetar a qualidade das DI armazenadas. Presume-se que a cada 2-3°C de variação na temperatura de armazenamento significa reduzir em 1 dia a vida útil das DI (ZOU & YANG, 2000). De fato, quando os espermatozoides são expostos a flutuações de temperatura de armazenamento, ocorrem alterações no metabolismo espermático na tentativa de adaptação dos espermatozoides a essa mudança climática. Como consequência ocorre a depleção de nutrientes e tampões do diluente devido ao aumento da atividade metabólica, o que prejudica a qualidade da DI (PETRUNKINA et al., 2005).

O espermatozoide suíno é extremamente sensível a baixas temperaturas (PETRUNKINA et al., 2005), sendo que as quedas rápidas de temperatura e os choques térmicos são os principais motivos relacionados à sensibilidade por resultarem em alterações permanentes na membrana espermática (PARKS & LYNCH, 1992). Um resfriamento de temperaturas inferiores a 15°C resulta na diminuição da taxa de sobrevivência espermática, causada por alterações estruturais e bioquímicas que levam à ruptura da membrana plasmática do espermatozoide, degeneração do acrossoma e perda da permeabilidade seletiva da membrana (BORTOLLOZO et al., 2005b). Quedas de temperatura acima de 2°C já são suficientes para

diminuir a qualidade e a vida útil das DI. Portanto, é importante o monitoramento da temperatura dentro da conservadora de sêmen, procurando evitar flutuações e manter a temperatura ideal. O controle pode ser feito por simples termômetros ou data loggers computadorizados (YOUNG, 2008).

2.3.2 Efeito da Homogeneização

A rotação das doses de sêmen suíno é uma prática comum durante o período de armazenamento e tem como objetivo prevenir a sedimentação do sêmen armazenado (KITAJI et al., 2014). A ausência de homogeneização nas DI leva à sedimentação dos espermatozoides, o que poderia ser mais um fator capaz de interferir na qualidade das DI armazenadas. Sabe-se que o efeito da gravidade causa sedimentação gradual de espermatozoides imóveis, gotas citoplasmáticas, microrganismos e outras partículas menores na DI, o que poderia causar um microambiente tóxico para os espermatozoides (BELSTRA, 2007). A agitação ou homogeneização das DI durante o tempo de armazenamento promove a ressuspensão do conteúdo sedimentado e, portanto, poderia ser benéfica para a qualidade espermática. Atualmente, para evitar a sedimentação do sêmen, a rotação manual diária ou o uso de conservadoras de sêmen com sistema de rotação automática tem sido amplamente utilizada na prática da IA (KITAJI et al., 2014). Contudo, existem dados contraditórios sobre o efeito da homogeneização de DI na sobrevivência espermática (RODRIGUEZ-GIL & RIGAU, 1995).

O efeito benéfico da homogeneização teria relação com a ressuspensão e redistribuição de nutrientes e demais componentes do diluente para as células espermáticas (RODRIGUEZ-GIL & RIGAU, 1995). Segundo esses autores, Rodriguez-Gil; Rigau (1995), pioneiros no estudo do efeito da sedimentação, o percentual de motilidade progressiva de DI é maior em amostras homogeneizadas do que não homogeneizadas, assim como o percentual de acrossomas alterados é significativamente maior em amostras armazenadas durante 48h sem agitação. Entretanto, estudos realizados por Simmet (1998) não encontraram resultados que apresentassem alguma evidência de que a sedimentação tenha qualquer efeito prejudicial sobre a motilidade espermática e integridade acrossômica. Recentemente, Schulze et al. (2015) concluíram que a homogeneização apresenta, na verdade, efeito prejudicial à qualidade espermática e não deve ser recomendada para a prática da IA. Nesse trabalho, foi observada uma menor integridade de membrana nos espermatozoides presentes em DI rotacionadas continuamente (armazenadas em conservadora automática) em relação aos espermatozoides de DI rotadas manualmente duas vezes por dia, e aos espermatozoides de DI não rotacionadas.

Todavia, tanto as DI armazenadas com rotação automática quanto as armazenadas com movimento de rotação manual, apresentaram perdas da integridade da membrana no terceiro dia de armazenamento, assim como queda de motilidade e diferenças nos padrões cinéticos no dia cinco de armazenamento.

Apesar das divergentes opiniões, sabe-se que a homogeneização das DI duas vezes por dia tem sido feita para examinar de forma rápida as DI já armazenadas, onde é possível verificar se a unidade de armazenamento de sêmen está funcionando corretamente (BELSTRA, 2007).

3. ARTIGO: INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO NA QUALIDADE DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO EM DIFERENTES DILUENTES DE CONSERVAÇÃO.

3.1 Introdução

A qualidade do sêmen é essencial para o sucesso e otimização dos ganhos obtidos por meio da IA (BROEKHUIJSE et al., 2011a). Sabe-se que a IA em suínos é realizada com DI resfriadas e mantidas a 15-18°C por um período que pode variar de acordo com diluente empregado (JOHNSON et al., 2000). A concepção de métodos que busquem estabelecer padrões de qualidade para o processamento e armazenamento das DI é primordial, uma vez que esses fatores estão relacionados tanto com a fertilidade quanto com o desempenho reprodutivo de um plantel (BELSTRA, 2007).

A homogeneização de doses de sêmen suíno é uma técnica praticada durante o período de armazenamento com o intuito de prevenir a sedimentação do sêmen (KITAJI et al., 2014), a qual poderia ser prejudicial para a qualidade da DI, pois aparentemente altera a disponibilidade de diluente para determinados espermatozoides podendo prejudicar a sobrevivência dos mesmos. Durante o período de armazenamento, as células espermáticas das DI são submetidas à diluição, mudança de microambiente, resfriamento e envelhecimento. A função espermática ao longo desses processos é influenciada pelas condições do meio com o diluente (BELSTRA, 2007).

O diluente utilizado no processamento de DI visa permitir a viabilidade do espermatozoide durante um determinado período, estipulando o intervalo de tempo ideal para a utilização da DI na IA (JOHNSON et al., 2000). Esses diluentes classificam-se de acordo com sua capacidade de manter a motilidade da dose espermática acima de 70% nesse período e são denominados diluentes de curta ação, os quais asseguram a motilidade por um período de até

72 horas, e média e longa ação, os quais asseguram esses padrões durante cinco ou sete a dez dias (AMBROGI et al., 2006).

Contudo, ainda existem dúvidas a respeito da frequência ideal de homogeneização das DI em relação à qualidade e ao diluente empregado na sua preparação. O objetivo do estudo foi verificar a qualidade das DI frente a técnicas de diferentes frequências de agitação e diferentes diluentes.

3.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido na granja experimental e no laboratório de reprodução animal do Setor de Suínos, localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de maio de 2015. Para a realização do experimento foram utilizadas vinte e oito doses inseminantes procedentes de sete reprodutores suínos adultos e sexualmente maduros.

As análises de motilidade e concentração do ejaculado foram feitas pelo sistema CASA (SpermVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) em câmaras de contagem de 20 µm de profundidade (Leja[®], Nieuw-Vennep, Holanda). Apenas ejaculados com mínimo de 70% de motilidade e até 20% de células com defeitos espermáticos foram aprovados para a produção de doses. As doses foram produzidas em *split sample* em diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) e Androstar[®] Plus (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), com aproximadamente 1,5 bilhões de espermatozoides e 45 ml de volume, totalizando quatro doses inseminantes por ejaculado. As doses foram envasadas em flexitubos e permaneceram em temperatura ambiente (23°C) por 120 minutos para estabilização, sendo posteriormente armazenadas em uma conservadora de sêmen à temperatura média de 17,8°C ± 0,49 por sete dias. Durante o armazenamento, as doses foram submetidas aos seguintes tratamentos: T1, com homogeneização manual das doses, uma vez ao dia, e T2, com agitação mecânica e automatizada das doses quatro vezes por dia, durante dois minutos. A agitação mecânica das doses foi realizada em uma conservadora com movimentação automatizada (Equittec, Marau, Brasil) específica para essa finalidade, enquanto a agitação manual foi feita pela rotação completa de 360° de cada DI.

As doses inseminantes foram avaliadas em quatro momentos segundo o seguinte cronograma: h0 (pós-estabilização), h24, h72 e h168. As motilidades total, progressiva e local dos espermatozoides foram avaliadas no sistema CASA (AndroVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), com uso de câmaras de 20 µm (Leja[®], Nieuw-Vennep, Holanda). Para

a avaliação, 1 ml de cada dose foi incubado a 38°C por 10 minutos. Todos os materiais que entraram em contato com as células espermáticas estavam previamente aquecidos a 38°C. As características de motilidade avaliadas no sistema CASA foram as seguintes: ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio; BCF - frequência com que o traçado real cruza o traçado médio; DAP - distância percorrida do traçado médio; DCL - distância percorrida real; DSL - distância percorrida em linha reta; motilidade total; motilidade progressiva; VAP - velocidade trajeto médio; VCL - velocidade em linha curvilínea; VSL - velocidade em linha reta; linearidade (VSL/VCL); STR (Retilinearidade) - VSL/VAP; WOB (Wobble) - VAP/VCL.

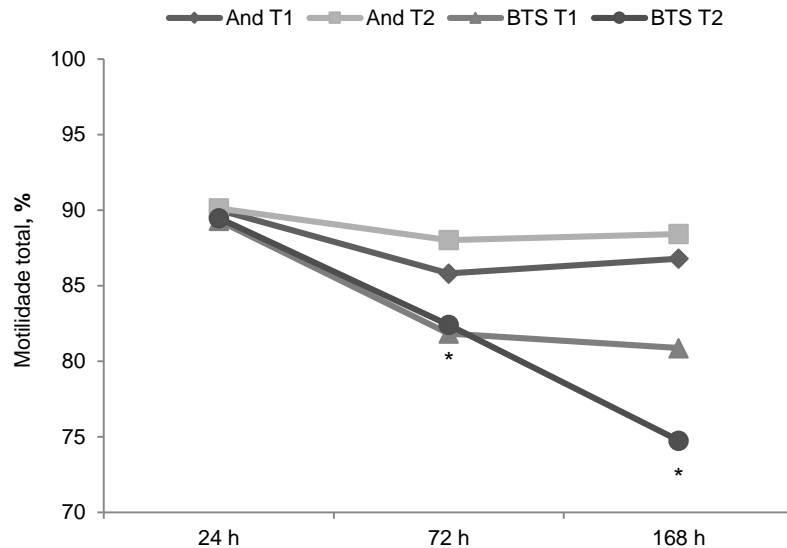
A morfologia espermática do sêmen *in natura* foi avaliada através de uma preparação úmida entre lâmina e lamínula sob microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, sendo classificadas 200 células de acordo com a metodologia descrita por Hancock (1956). Nos momentos h72 e h168 também foi avaliada a morfologia espermática das DI, pela mesma técnica, entretanto levando em conta apenas a contagem de defeitos de acrossoma.

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o procedimento GLIMMIX do pacote de estatística SAS (SAS 9.3, 2011). As variáveis foram analisadas como medidas repetidas, em modelo com efeitos fixos da frequência de homogeneização, do diluente, do momento de análise e de suas interações, além do efeito aleatório dos machos doadores do sêmen. A motilidade total, a motilidade progressiva e a integridade de acrossoma foram avaliadas considerando uma distribuição binomial. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$).

3.2 Resultados e Discussão

A motilidade espermática total não foi influenciada pela frequência de homogeneização, mas foi influenciada pela interação do diluente e do momento (Figura 1; $P \leq 0,05$), sendo superior no diluente Androstar[®] Plus quando comparado ao BTS, nas 72 e 168h de armazenamento. Já a motilidade progressiva foi menor com BTS do que Androstar[®] Plus, em todos os momentos de avaliação (Tabela 1).

Figura 1 - Motilidade total de espermatozoides suínos ao longo do armazenamento em função do diluente e tratamento. Houve interação entre diluente e momento. * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os diluentes dentro do momento. T1= homogeneização manual das doses, uma vez ao dia; T2= agitação mecânica e automatizada das doses, quatro vezes por dia, durante dois minutos.



Os dados de integridade de acrossoma e cinética espermática estão apresentados na Tabela 1. As variáveis analisadas não diferiram entre os grupos de homogeneização, o que contradiz com o efeito benéfico relatado por Rodríguez-Gil e Rigau (1995), os quais avaliaram a qualidade de DI não homogeneizadas e homogeneizadas permanentemente em uma conservadora com sistema de rotação das DI (300 rotações por minuto) durante o armazenamento. A motilidade total e progressiva nas horas 48 e 92 foram inferiores nas doses não homogeneizadas quando comparadas às doses homogeneizadas permanentemente. O percentual de acrossomas danificados também foi significativamente maior em doses não homogeneizadas, sendo observado após 48 h e se acentuando nas 92 h de armazenamento. Os autores sugerem que a agitação favorece a distribuição uniforme dos componentes do diluente para todos os espermatozoides, permitindo a melhor preservação das células durante o armazenamento.

O fato de que a agitação das doses não afetou a qualidade espermática também está em contradição com o efeito prejudicial observado por Schulze et al. (2015), quando compararam DI armazenadas sem agitação, com agitação manual (rotação de 180° a cada 12 h) e com agitação mecânica em uma conservadora de movimentação automática (cinco rotações de 360° por hora). A motilidade total e a morfologia espermática não diferiram entre os grupos de

homogeneização até o terceiro dia de armazenamento, de modo semelhante ao observado no presente estudo. No entanto, a agitação mecânica reduziu significativamente a integridade de membrana espermática – parâmetro não avaliado neste experimento. A perda da motilidade e alterações nos padrões de cinética espermática foram evidenciadas nas DI submetidas à rotação manual ou automática, após um teste de termorresistência prolongado (300 min a 38°C), no dia cinco de armazenamento. Especula-se que a rotação das doses promove a perda de CO₂ do meio líquido e acelera a alcalinização da dose de sêmen, como ficou evidente no trabalho de Schulze et al. (2015) com o aumento do pH de 7,3 para 7,5 nas DI com rotação manual ou automática. No presente estudo, as DI submetidas à rotação automática não apresentaram esses efeitos, mesmo durante o armazenamento por tempo prolongado (BTS até sete dias), o que indica que os efeitos da alteração do pH se tornam evidentes em espermatozoides submetidos a um estresse maior do que o envelhecimento celular. No entanto, a frequência maior de agitação no trabalho de Schulze et al. (2015), em comparação à utilizada no presente estudo, pode ter intensificado o efeito prejudicial da agitação na viabilidade das células espermáticas.

A ausência do efeito da agitação sobre a motilidade e integridade de acrossoma reforça alguns dos resultados encontrados por Simmet (1998), em sua comparação da qualidade espermática de DI sem homogeneização, com homogeneização uma vez ao dia e com homogeneização permanente durante um período de cinco dias. Os autores não observaram diferença significativa na motilidade espermática entre os grupos de homogeneização até três dias de armazenamento, embora, em condições de permanente rotação, houve redução da motilidade após cinco dias de armazenamento. O percentual de acrossomas anormais também não foi diferente entre os grupos, evidenciando que o aumento da frequência de agitação de DI não afeta de forma prejudicial ou benéfica a qualidade da dose. Dessa forma, tanto Simmet (1998) quanto Schulze et al. (2015) sugerem que a prática da homogeneização de DI de sêmen suíno não se faz necessária, visto que o efeito da sedimentação não afeta de forma prejudicial a qualidade das doses.

Para várias variáveis (integridade de acrossoma, motilidade progressiva, BCF, DCL, DAP, VCL, VSL, VAP e STR) foi observado efeito do diluente e do momento, enquanto que para ALH houve efeito do momento, e para WOB o efeito do diluente (Tabela 1). A linearidade espermática (VSL/VCL) diferiu entre os diluentes nas 24 e 72h ($P < 0,05$), mas não nas 168 h. O efeito do momento de armazenamento na qualidade das DI reflete as consequências do envelhecimento celular. Durante o período de armazenamento ocorrem mudanças funcionais e estruturais nos espermatozoides mesmo com a ação do diluente, reduzindo a capacidade de

fecundação dos espermatozoides e afetando a qualidade da dose espermática (WABERSKI, 1994). A superioridade do diluente de longa ação Androstar® Plus na manutenção prolongada da qualidade espermática em comparação ao diluente de curta ação BTS já era esperada, uma vez que a função do diluente é permitir que o espermatozoide se mantenha viável durante um determinado período, sendo esse período variável de acordo com o diluente (JOHNSON et al., 2000). O efeito dos diluentes observado nesse estudo pode ser atribuído aos componentes adicionais dos diluentes de ação prolongada, que asseguram melhor controle de pH e proteção de membranas (AMBROGI et al., 2006).

4 CONCLUSÃO

A frequência de agitação não afeta a qualidade das doses de sêmen. Ocorre diminuição da qualidade espermática devido ao envelhecimento celular ao longo do armazenamento, sendo que o diluente de longa ação retarda o efeito negativo do tempo de armazenamento. Não há necessidade de homogeneização diferenciada das doses de sêmen de acordo com o diluente utilizado.

Tabela 1 – Integridade de acrossoma, motilidade progressiva e cinética espermática de doses de sêmen de acordo com o tempo de armazenamento, diluente e tratamento. Valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Variável	Momento	Androstar® Plus		BTS	
		T1	T2	T1	T2
Integridade de Acrossoma ¹ , %	72 h	99,4 \pm 0,24	99,6 \pm 0,19	98,7 \pm 0,36	98,7 \pm 0,36
	168 h	97,8 \pm 0,57	98,5 \pm 0,44	96,5 \pm 0,74	96,6 \pm 0,71
Motilidade Progressiva ¹ , %	24 h	83,9 \pm 4,90	83,9 \pm 4,88	81,7 \pm 5,41	81,7 \pm 5,41
	72 h	77,7 \pm 6,31	80,5 \pm 5,73	71,6 \pm 7,41	72,7 \pm 7,24
	168 h	78,1 \pm 7,27	80,8 \pm 6,59	69,4 \pm 9,03	62,1 \pm 10,00
BCF ¹ , Hz	24 h	19,4 \pm 2,12	19,5 \pm 2,12	16,9 \pm 2,12	16,9 \pm 2,12
	72 h	17,1 \pm 2,13	17,5 \pm 2,13	13,2 \pm 2,13	14,2 \pm 2,13
	168 h	17,3 \pm 2,34	17,4 \pm 2,34	12,9 \pm 2,34	11,9 \pm 2,34
DCL ¹ , μ m	24 h	46,3 \pm 4,17	46,6 \pm 4,17	44,4 \pm 4,17	43,7 \pm 4,17
	72 h	43,5 \pm 4,25	41,7 \pm 4,25	37,9 \pm 4,25	38,3 \pm 4,25
	168 h	44,9 \pm 4,99	44,0 \pm 4,99	36,7 \pm 4,99	31,8 \pm 4,99
DSL ¹ , μ m	24 h	14,7 \pm 1,40	14,9 \pm 1,40	13,0 \pm 1,40	12,9 \pm 1,40
	72 h	13,4 \pm 1,57	13,7 \pm 1,57	10,7 \pm 1,57	11,2 \pm 1,57
	168 h	13,0 \pm 1,82	13,7 \pm 1,82	10,4 \pm 1,82	9,4 \pm 1,82
DAP ¹ , μ m	24 h	20,5 \pm 1,72	20,6 \pm 1,72	18,8 \pm 1,72	18,4 \pm 1,72
	72 h	19,1 \pm 1,92	18,7 \pm 1,92	15,7 \pm 1,92	16,0 \pm 1,92
	168 h	19,9 \pm 2,32	19,5 \pm 2,32	15,3 \pm 2,32	13,2 \pm 2,32
VCL ¹ , μ m/s	24 h	112,2 \pm 11,49	113,8 \pm 11,49	105,9 \pm 11,49	106,8 \pm 11,49
	72 h	106,0 \pm 11,47	101,8 \pm 11,47	91,9 \pm 11,47	93,0 \pm 11,47
	168 h	110,4 \pm 13,14	107,5 \pm 13,14	90,8 \pm 13,14	76,6 \pm 13,14
VSL ¹ , μ m/s	24 h	36,4 \pm 3,66	37,1 \pm 3,66	31,8 \pm 3,66	32,3 \pm 3,66
	72 h	33,6 \pm 4,06	34,3 \pm 4,06	26,4 \pm 4,06	27,9 \pm 4,06
	168 h	33,1 \pm 4,70	34,4 \pm 4,70	26,4 \pm 4,70	23,0 \pm 4,70
VAP ¹ , μ m/s	24 h	49,8 \pm 4,64	50,5 \pm 4,64	45,1 \pm 4,64	45,4 \pm 4,64
	72 h	46,8 \pm 5,02	45,8 \pm 5,02	38,4 \pm 5,02	39,1 \pm 5,02
	168 h	49,2 \pm 5,97	48,0 \pm 5,97	38,2 \pm 5,97	32,0 \pm 5,97
STR ¹ , %	24 h	71,5 \pm 1,90	71,3 \pm 1,90	69,1 \pm 1,90	68,5 \pm 1,90
	72 h	69,5 \pm 2,09	72,4 \pm 2,09	66,0 \pm 2,09	68,6 \pm 2,09
	168 h	66,1 \pm 2,42	68,7 \pm 2,42	65,8 \pm 2,42	67,4 \pm 2,42
ALH ² , μ m	24 h	1,2 \pm 0,08	1,2 \pm 0,08	1,3 \pm 0,08	1,2 \pm 0,08
	72 h	1,2 \pm 0,09	1,1 \pm 0,09	1,2 \pm 0,09	1,1 \pm 0,09
	168 h	1,2 \pm 0,12	1,2 \pm 0,12	1,1 \pm 0,12	0,9 \pm 0,12
WOB ³ , %	24 h	44,2 \pm 0,60	44,4 \pm 0,60	42,7 \pm 0,60	42,3 \pm 0,60
	72 h	44,4 \pm 0,88	45,4 \pm 0,88	42,3 \pm 0,88	42,7 \pm 0,88
	168 h	44,3 \pm 1,02	44,1 \pm 1,02	42,4 \pm 1,02	42,4 \pm 1,02

¹ Efeito do diluente e momento ($P \leq 0,05$); ² Efeito do momento ($P \leq 0,05$); ³ Efeito do diluente ($P \leq 0,05$).

T1= homogeneização manual das doses, uma vez ao dia; T2= agitação mecânica e automatizada das doses, quatro vezes por dia, durante dois minutos.

BCF: frequência com que o traçado real cruza o traçado médio; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio; DCL: distância percorrida real; DSL: distância percorrida em linha reta; DAP: distância percorrida do traçado médio; VCL: velocidade em linha curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade trajeto médio; STR (Retilinearidade): VSL/VAP; WOB (Wobble): VAP/VCL.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A homogeneização de DI é uma prática adotada na rotina de granjas com objetivo de garantir a qualidade das doses no momento da IA. No entanto, de acordo com os resultados apresentados no presente experimento, a intensificação do processo de agitação de DI não provocaria efeito benéfico tampouco prejudicial frente à qualidade das doses espermáticas. O trabalho sugere que a qualidade das DI está relacionada com a duração do período de armazenamento, pois a motilidade dos espermatozoides diminui com o passar do tempo, assim como com o diluente utilizado na fabricação da dose. Todavia, os diluentes apresentaram comportamento de acordo com o esperado, visto que o BTS assegurou a motilidade acima de 70% até 72h e o Androstar[®] Plus até as 168h avaliadas no estudo.

Por conseguinte, a substituição do protocolo tradicional, realizado de forma manual com homogeneização das doses uma vez ao dia, pela utilização de uma conservadora de sêmen com movimentação automática das DI, várias vezes ao dia, não se faz necessário. O que é justificado pela intensificação do processo de homogeneização não aumentar a qualidade das DI.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5–17, 2014.
- BELSTRA, B. On-farm semen receiving, storage and use for a successful AI program. Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. 9 p. 2007.
- BENNEMANN, P. E. Como melhorar o desempenho produtivo pela inseminação artificial. In: V Seminário Internacional de Aves e Suínos – AveSui, 2006. **Anais...** Florianópolis, SC, p. 63-75.
- BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 5-16, 2008.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Vantagens e limitações no uso da IA em suínos. In: BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. (Eds.). **Suinocultura em Ação – Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. p 23-26, 2005a.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F. M.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L. Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. (Eds.). **Suinocultura em Ação – Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. p 69–90, 2005b.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; ŠOŠTARIĆ, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1473–1486, 2011a.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 779–789, 2011b.

CORRÊA, M. N.; MEINCKE, W.; LUCIA, T.; DESCHAMPS, J. C. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Printpar, 2001.

DE AMBROGI, M.; BALLESTER, J.; SARAVIA, F.; et al. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 5, p. 543–552, 2006.

DIDION, B. A. Computer – assisted sêmen analysis and its utility for profiling boar sêmen samples. **Theriogenology**. v. 70. p. 1374 – 1376. 2008.

FERREIRA, F. M.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P. WENTZ, I. Processamento e armazenamento das doses inseminantes In: BORTOLOZZO, F. P. WENTZ, I. **Inseminação Artificial na Suinocultura tecnificada**. Suinocultura em Ação. 2005. p. 91 – 105.

FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 67 – 68, 1997.

FLOWERS, W. L. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. **Midwest Boar Stud Conference II**, p. 15 – 22, 2004a.

FLOWERS, W. L. Data on various extenders: viability over time. **Midwest Boar Stud Conference II**, p. 91–96, 2004b.

FLOWERS, W. L. Triennial reproduction symposium: sperm characteristics that limit success of fertilization. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 7, p. 3022–3029, 2013.

FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W. T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1324–1336, 2008.

GADEA J., MATAS C. & LUCAS X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hivp/assay. **Animal Reproduction Science**. v. 56, p. 95–108, 1998.

GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v. 1, p. 17–27, 2003.

GADEA, J. Sperm under the microscope. **Pig Int**, v. 32, p. 24-27, 2002.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431–444, 2005. 17

GARCÍA HERREROS, M.; APARICIO, I. NÚÑEZ, I.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C.; PEÑA VEJA, F. J. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. **Theriogenology**, v. 63, p. 795–805, 2005.

HANSEN, C. et. al. Comparison of FACSCount AF system, improved meubauer hemocytometer, corning 254 photometer, spermvision, ultimate and nucleocounter SP-100 for

determination of sperm concentration of boar semen. **Theriogenology**, v. 66, p. 2188 – 2194, 2006.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **The Veterinary Record**, v. 71, p. 664-665, 1959.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1, p. 143–172, 2000.

KITAJI, H.; OOKUTSU, S.; SATO, M.; MIYOSHI, K. A new rolling culture-based in vitro fertilization system capable of reducing polyspermy in porcine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 86, p. 494–498, 2014.

LEVIS, D. G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: Proceedings of the 4th INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, Beltsville, Maryland, USA. 2000, p. 121 – 128.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255–266, 1992.

PETRUNKINA, A. M.; VOLKER, G.; WEITZE, K.-F.; et al. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2278–2299, 2005.

RIESENBECK, A. Review on international trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p 1 – 3, 2011.

ROCA, J.; VÁZQUEZ, J. M.; GIL, M. A.; et al. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. s2, p. 43–53, 2006.

ROCA, J.; PARRILLA I.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 79–83, 2011.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 141-146, 1995.

RODRIGUEZ – MARTINEZ, H.; ERIKSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación com fertilidade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB “INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS”, 3., 2000, Flores da Cunha. **Anais**. Porto Alegre: Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 13-33.

RODRIGUEZ – MARTINEZ, H. Laboratory semen assesment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38. p. 312 – 318. 2003.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. **Animal Reproduction**, v. 10, p.268–276, 2013.

SCHULZE, M.; RUEDIGER, K.; MUELLER, K.; et al. Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 1-2, p. 70–76, 2013.

- SCHULZE, M.; KÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**. Doi: 10.1111/rda.12532, 2015.
- SIMMET, C.; RATH, D.; LORTON, S. Dose sedimentation of liquid boar semen influence semen quality during storage? Proceedings of the **15th IPVS Congress**, v. 3, p. 62, 1998.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VIANNA, W. L.; BRUNO, D. G.; NAMINDOME, A.; ROSSETO, A. C.; RODRIGUES, P. H. M.; PINESE, M. E.; MORETTI, A. S. Estudo comparativos da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, p. 2054 – 2059, 2004.
- ZOU, C.X.; YANG, Z.M. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. **Theriogenology**, v. 53, p. 1477-1488, 2000.
- WABERSKI, D. WEITZE, K. F.; LIETMANN, C.; LUBBERT ZUR LAGE, W.; BORTOLOZZO, F.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v. 41. p. 1367–1377, 1994.
- WABERSKI, D. Critical steps from semen collection to insemination. **In:** Proceedings of the Annual Meeting of EU-AI-Vets. Ghent, Belgium. p. 66 – 69, 2009.
- WEITZE, K. F. Novos conceitos na diluição do ejaculado suíno: como as células espermáticas respondem aos desafios impostos? In: VII Simpósio Internacional de Suinocultura. **Anais**. Porto Alegre, RS. 2012. p. 17- 30.
- YOUNG, B.; DEWEY, C. E.; FRIENDSHIP R. M. Prevalence and causes of inappropriate temperatures in on-farm semen storage units in Ontario. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, p. 92 – 95, 2008.