

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

**INFLUÊNCIA DO AR NA QUALIDADE DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO
ARMAZENADAS A 17 °C**

Autor: Caroline de Veronez Ribeiro

PORTO ALEGRE

2015/2

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

**INFLUÊNCIA DO AR NA QUALIDADE DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO
ARMAZENADAS A 17 °C**

**Autor: Caroline de Veronez Ribeiro
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
2015/2**

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do ar na qualidade de doses de sêmen suíno durante o período de armazenamento. Foram utilizados 4 ejaculados de 5 reprodutores suínos sexualmente maduros. As doses foram produzidas em diluente BTS e distribuídas em três tratamentos, diferindo na quantidade de sêmen diluído e na quantidade de ar retido no interior das embalagens: T0 (100% de sêmen diluído e 0% de ar), T25 (75% de sêmen diluído e 25% de ar) e T50 (50% de sêmen diluído e 50% de ar). Após o período de estabilização, as doses foram armazenadas em uma conservadora ($17,3 \pm 0,5$ °C) por um período total de 120 horas. As análises de motilidade das doses foram realizadas no sistema CASA em quatro momentos distintos após a diluição final: 24, 72 e 120 horas. A aferição do pH foi realizada após a diluição do sêmen e nas doses armazenadas 24, 48, 72 e 120 horas após o processamento. O percentual de defeitos de acrossoma foi avaliado nos momentos 72h e 120h. O pH das doses de sêmen foi influenciado significativamente pela quantidade de ar presente no interior das embalagens, sendo que o valor desse parâmetro foi mais elevado em T50 em relação a T0 e T25. Em relação aos parâmetros de motilidade espermática, a porcentagem de espermatozoides com motilidade total, motilidade progressiva e motilidade rápida foi superior em T0 em comparação com T50 após 120 horas de armazenamento. A integridade do acrossoma, a motilidade lenta e a motilidade local foram influenciadas apenas pelo momento de avaliação. No teste de termorresistência, a motilidade total, a motilidade progressiva e a motilidade rápida tiveram melhor desempenho em T0 em comparação com T50 e T25. Todos os parâmetros de motilidade foram influenciados negativamente pelo tempo de incubação a 38 °C. Dessa forma, conclui-se que a presença de ar no interior das embalagens afeta a qualidade das doses de sêmen. Embora o efeito na motilidade espermática tenha sido evidente apenas no último dia de armazenamento (h120), alterações no pH entre os tratamentos foram observadas já no primeiro momento de análise.

Palavras-chave: ar; doses inseminantes; suíno; motilidade; pH.

ABSTRACT

This study was conducted in order to evaluate the influence of air on porcine semen quality during the storage period. Four ejaculates from 5 sexually mature boars were used. The samples were diluted in a BTS-extender and distributed in three groups differing on the amount of air entrapped within the recipients and on the volume of extended semen used: T0 (100% of extended semen and 0% of air), T25 (75% of extended semen and 25% of air), and T50 (50% of extended semen and 50% of air). After the stabilization period, insemination doses were stored at 17.3 ± 0.5 °C for 120 hours. The motility parameters were determined using CASA-analysis 24, 72 and 120 hours after collection. The percentage of acrosome defects was evaluated at 72h and 120h. The pH was measured 24, 48, 72 and 120 hours after the final dilution. At day 5, samples were incubated at 38 °C for the thermoresistance test and sperm motility was assessed after 30 and 120 minutes of incubation. The pH was significantly influenced by the amount of air present within the recipient, and the value of this parameter was higher in T50 when compared to T25 and T0. Regarding the sperm motility parameters, the percentage of spermatozoa with total motility, slow motility and progressive motility was superior at T0 when compared to T50 after 120 hours of storage. The acrosome integrity, slow motility and local motility were only influenced by the evaluation time. At the thermoresistance test, total motility, motility and progressive motility performed better at T0 compared to T25 and T50. All motility parameters were negatively influenced by the incubation time at 38 °C. Thus, it is possible to conclude that the presence of air within the recipients affects the extended semen quality. Although the effect on sperm motility was only evident on the last day of storage (h120), the differences in pH between treatments were clear from the very beginning.

Keywords: air; semen dose; boar; motility; pH

LISTA DE ABREVIATURAS

µm - Micrômetro

°C - Graus Celsius

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - Frequência de batimento de cauda

BTS - Beltsville Thawing Solution

CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis

CPS - Central de Processamento de Sêmen

DAP - Deslocamento médio

DCL - Deslocamento curvilíneo

DSL - Deslocamento linear

Hz - Hertz

IA - Inseminação artificial

LIN - Linearidade (VSL/VCL)

STR - Retilinearidade (VSL/VAP)

pH - Potencial Hidrogeniônico

VAP - Velocidade média percorrida

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade em linha reta

WOB - Coeficiente de oscilação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reconstrução da trajetória espermática no sistema CASA.....15

ARTIGO:

Figura 1 - Perfil de pH de cada tratamento ao longo do armazenamento.....29

Figura 2 - Parâmetros de motilidade de doses de sêmen de acordo com o tempo de armazenamento e o tratamento.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de cinética celular medidas pelo sistema CASA.16

ARTIGO:

Tabela 1 - Valor médio dos parâmetros de motilidade espermática de amostras de sêmen analisadas após 30 e 120 minutos de incubação à 38 °C.31

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente a toda minha família pelo apoio, amor e vibração junto às minhas conquistas. Amo muito vocês! À minha mãe, Claudete, por me fazer acreditar que tudo é possível. Obrigada por nunca me deixar desistir. Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a ti. À minha irmã, Jacqueline, que me ensinou que brigas são passageiras e que o amor entre irmãos é verdadeiro. Ao meu pai por me mostrar que o caráter e a humildade são bens preciosos na vida de um ser humano.

Com muito carinho, ao Felipe, que foi muito mais que um namorado: amigo, confidente, motorista, psicólogo e, acima de tudo, um verdadeiro incentivador. Não teria conseguido sem ti. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos professores do Setor de Suínos, Ivo Wentz, Mari Lourdes Bernardi, David Barcellos e, em especial, ao Professor Fernando P. Bortolozzo, pela amizade, disponibilidade, conselhos e ensinamentos passados durante todos esses anos.

À equipe do experimento pelo suporte necessário para sucesso desse trabalho. A ajuda de vocês foi imprescindível! À minha orientadora, Ana Paula Mellagi, pela amizade, confiança, otimismo e compreensão. Obrigada por fazer desse projeto uma experiência tão agradável! À Mariana pelo companheirismo e por nunca ter medido esforços para que tudo desse certo. Um agradecimento especial à Júlia pela torcida, apoio e companhia durante o experimento. Conte sempre comigo!

Às amigas que a Veterinária me proporcionou: Júlia, Carine, Xanxerê, Malu e Luiza. Obrigada pelas risadas, abraços, indias e, principalmente, pela amizade verdadeira. Sem vocês, nada teria tido graça.

Aos colegas do Setor de Suínos pelos momentos inesquecíveis ao longo desses anos. Em especial, ao Diogo Magnabosco (meu eterno orientador), Karine, Maria Clara, Evandro, Sato, Rafa Ulguim, Carol Malgarin, Lúcia e Thaís.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que acompanharam a minha trajetória ao longo do Curso de Medicina Veterinária.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Inseminação Artificial na Suinocultura	10
2.2 Avaliação Espermática	11
2.2.1 Motilidade Espermática.....	12
2.2.2 Concentração Espermática	13
2.2.3 Sistema CASA.....	14
2.2.4 Morfologia.....	17
2.2.4.1 Integridade do Acrossoma.....	18
2.3 Armazenamento de Doses Inseminantes	19
2.3.1 Tempo e Temperatura de Armazenamento	19
2.3.2 Presença do ar durante o armazenamento.....	21
3. ARTIGO: INFLUÊNCIA DO AR NA QUALIDADE DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS A 17 °C	23
3.1 Introdução	23
3.2 Materiais e Métodos	23
3.3 Resultados e Discussão	25
3.4 Conclusão	28
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
5. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A inseminação artificial tornou-se uma prática padrão na suinocultura tecnificada e desempenha um papel fundamental na performance reprodutiva do plantel. Atualmente, mais de 90% da IA na produção de suínos ao redor do mundo é realizada com o uso de diluentes que garantem um período viável das doses por até 5 dias de armazenamento a uma temperatura de 15 a 18°C (JOHNSON et al., 2000). Um dos principais objetivos das Centrais de Processamento de Sêmen (CPS) é produzir doses inseminantes de alta qualidade através da combinação de um manejo adequado, da manipulação correta do sêmen e dos aspectos que envolvem o bem estar do reprodutor, incluindo condições sanitárias ideais.

A qualidade das doses refrigeradas pode ser influenciada por diversos fatores que interagem e interferem na célula espermática, incluindo a temperatura das conservadoras, o tempo de armazenamento e o tipo de diluente utilizado (RODRÍGUEZ-GIL; RIGAU, 1995). Outro fator que poderia afetar a função espermática é o ar. Teoricamente, a manutenção do oxigênio no interior das embalagens durante o período de armazenamento é indesejável. Assim, alguns autores recomendam que, no momento do envase, o volume do recipiente seja completamente preenchido, a fim de garantir a maior durabilidade das doses inseminantes (AUSEJO et al., 2015). Esse procedimento, todavia, não é amplamente difundido e padronizado nas CPS (VYT et al., 2007).

O presente estudo, portanto, consistiu em avaliar a influência do ar na qualidade de doses de sêmen suíno durante o período de armazenamento, através da análise dessas doses pela utilização de um sistema de análise computadorizada de sêmen. O estudo comparou amostras de sêmen armazenadas em embalagens contendo diferentes quantidades de ar durante um período total de 120 horas. Desse modo, o projeto teve como objetivo encontrar respostas que possam auxiliar nas práticas de envase e armazenamento das doses, e assim minimizar fatores que possam prejudicar a qualidade espermática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminação Artificial na Suinocultura

A utilização da inseminação artificial (IA) na suinocultura moderna e tecnificada tem aumentado de forma marcante nos últimos anos. As primeiras tentativas dessa técnica foram realizadas na antiga URSS por Ivanov, em 1926 e 1927, e continuadas por Milanov e colaboradores entre 1930 e 1936 (JOHNSON et al., 2000). Em 1948, o Japão se lançou nesta prática, mas somente após 1955 é que o método começou a ser empregado em países como França, Inglaterra, Holanda e Bélgica (JONDET et al., 1971). Na atualidade, em torno de 30 milhões de matrizes são inseminadas nos 31 principais países produtores de carne suína e estima-se que mais de 99% dessas inseminações sejam realizadas com sêmen diluído, usado no mesmo dia, ou armazenado entre 15-20°C por um a cinco dias (RIESENBECK, 2011; JOHNSON et al., 2000).

No Brasil, a inseminação em suínos teve seu destaque a partir de 1975, principalmente na região sul, onde nasceram as primeiras centrais de inseminação artificial. O desenvolvimento da técnica no país aconteceu de acordo com a distribuição geográfica da produção, tendo ocorrido nos estados onde o nível técnico e a produtividade eram considerados superiores (SCHEID, 1991). Muito embora tenha tido uma expansão lenta e uso limitado na década de 70-80, não ultrapassando 3% do plantel brasileiro, atualmente, considerando o rebanho tecnificado de 1,67 milhões de matrizes (ABIPECS/ABCS, 2013), pondera-se que 95% das fêmeas sejam inseminadas.

A grande difusão da IA se deveu particularmente à criação de linhagens genéticas de machos terminais que transmitem aos seus descendentes as qualidades de carcaça necessárias à sua tipificação exigida pela indústria de carnes, de forma a poder atender às exigências de mercado (BORTOLOZZO et al., 2005a). Desse modo, através dessa prática foi possível se obter melhores níveis de produtividade, uma maior difusão de material genético de alta qualidade e uma diminuição dos custos de produção, apresentando-se atualmente como uma tecnologia sólida com aplicabilidade comercial e uso rotineiro em granjas tecnificadas (MATOS et al., 2010).

Visando aumentar a lucratividade do setor, a propagação da IA vem sendo acompanhada por uma evolução tecnológica constante. Um cuidado especial, entretanto, deve ser dedicado às práticas básicas de análise, processamento e armazenamento das doses inseminantes (MATOS et

al., 2010), uma vez que quedas na qualidade podem levar a prejuízos aos índices reprodutivos do rebanho (ALM et al., 2006). Assim, o treinamento e a reciclagem continuada das pessoas envolvidas no processo, a fiscalização periódica dos procedimentos rotineiros da técnica, o diagnóstico adequado do estro, a qualidade da dose inseminante são aspectos fundamentais para a aplicação desta técnica com obtenção de resultados economicamente viáveis (MATOS et al., 2008).

2.2 Avaliação Espermática

O potencial de fertilização de uma dose inseminante está ligado à qualidade dos espermatozoides. O exame dos ejaculados antes da IA é, portanto, absolutamente necessário e tem como finalidade a eliminação de amostras inadequadas para a realização da IA (VYT et al., 2008). A avaliação qualitativa do ejaculado é conduzida com objetivo de prever a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen ou potencial reprodutivo de um animal e visa determinar a viabilidade de processar o mesmo. Já o exame quantitativo é realizado com o objetivo de determinar o número de doses a serem produzidas a partir desse ejaculado (BORTOLOZZO et al., 2005b).

Ambos os aspectos quantitativos e qualitativos são influenciados por fatores como frequência de coleta, idade do reprodutor, raça/genética e época do ano (WOLF; SMITAL, 2009; COLENBRANDER; KEMP, 1990). Embora as relações entre o sêmen e a fertilidade da IA nem sempre sejam claras (XU et al., 1998), é evidente que a triagem competente do ejaculado pode reduzir a variabilidade nos índices reprodutivos. A morfologia espermática, a motilidade, o pH, a integridade da membrana e a condensação da cromatina já foram associados ao tamanho da leitegada, número de leitões nascidos vivos e natimortos, bem como a falhas de concepção e perdas embrionárias (MCPHERSON et al., 2014).

A primeira análise, imediatamente após a coleta, corresponde ao controle macroscópico do ejaculado e tem por objetivo julgar o volume, a cor, o odor, a densidade e a viscosidade do mesmo. Em seguida, um exame microscópico do sêmen é conduzido a fim de se atestar o potencial reprodutivo do cachaço. Os principais testes utilizados atualmente na rotina das centrais de inseminação incluem motilidade, morfologia e concentração espermática. Os métodos convencionais de análise desses parâmetros, tais como exame visual em microscópio de luz, são baratos e fáceis de executar. No entanto, os parâmetros convencionais somente dão uma ideia

aproximada do potencial de fertilização de um dado ejaculado (WABERSKI et al., 2011; VYT et al., 2008). Uma das maneiras de aumentar a acurácia e a padronização na avaliação das características seminais é através do sistema computadorizado de análise de sêmen (BROEKHUIJSE et al., 2011) que avalia parâmetros de forma objetiva, precisa e padronizada, eliminando a subjetividade da avaliação.

2.2.1 Motilidade Espermática

A motilidade é um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no oócito. Por ser um exame simples, rápido, de baixo custo e bom indicador da integridade e funcionalidade das membranas, a avaliação visual da motilidade espermática continua sendo o método usual nas CPS (BERNARDI, 2008). No entanto, este tipo de análise é bastante subjetiva e depende, além da qualificação do funcionário, da qualidade dos equipamentos disponíveis no laboratório, principalmente do microscópio e da platina de aquecimento de lâminas e lamínulas (BORTOLOZZO et al., 2005b).

O exame consiste em depositar uma amostra de sêmen (gota) entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e examinar ao microscópio óptico em aumento de 100 a 200 vezes. Nesse método de avaliação, os espermatozoides em movimento são classificados em um escore de 0 a 100%. O exame é concluído pela análise de três ou mais campos em um mesmo preparado. Usualmente, o valor mínimo aceitável de espermatozoides móveis para liberar um ejaculado para processamento é 70% (BORTOLOZZO et al., 2005b). FLOWERS (1997), em uma avaliação subjetiva da motilidade, demonstrou haver relação entre a proporção de espermatozoides móveis no ejaculados e os parâmetros de fertilidade na presença de motilidade abaixo 60%. Todavia, quando a motilidade espermática foi acima 60%, a taxa de prenhez e o tamanho de leitegada não foram prejudicados. Assim, conclui-se que uma vez alcançados os valores mínimos desejáveis, a motilidade espermática passa a ter fraca correlação com a fertilidade (BROEKHUIJSE et al., 2012).

A motilidade espermática é considerada um dos principais parâmetros utilizados na validação da qualidade de um ejaculado, entretanto as correlações com a fertilidade têm sido baixas e contraditórias, atribuídas, principalmente, à subjetividade do teste (GADEA et al., 2005; BROEKHUIJSE et al., 2011). Ainda, de acordo com POPWELL; FLOWERS (2004), a impossibilidade de prever a fertilidade *in vivo* através das avaliações de motilidade durante o

armazenamento e/ou morfologia do sêmen pode ser devida ao fato de que essas avaliações não são capazes de informar o número mínimo de espermatozoides necessários para atingir o máximo de fertilidade, o tempo que o sêmen mantém a capacidade fecundante ou mesmo a taxa de prenhez e tamanho de leitegada que podem ser alcançados com as amostras avaliadas.

Atualmente, a avaliação da motilidade já pode ser realizada utilizando um sistema de análise computadorizada de sêmen (*Computer-Assisted Semen Analysis – CASA*). Essa técnica, conforme será explicado mais adiante, permite a análise de um número elevado de espermatozoides em um curto espaço de tempo, fornecendo informações detalhadas sobre a qualidade do movimento individual do espermatozoide, velocidade, trajetória e percentagem de espermatozoides com movimentos circulares. Dessa forma, o sistema CASA mostra-se como uma ferramenta útil na identificação de diferenças entre os machos utilizados em programas de IA (TEJERINA et al., 2008) e na seleção de ejaculados com melhor qualidade (BROEKHUIJSE et al., 2012).

2.2.2 Concentração Espermática

A concentração espermática é um parâmetro quantitativo que, aliado ao volume total do ejaculado, permite determinar o número total de espermatozoides e, conseqüentemente, o número de doses inseminantes que podem ser produzidas. Existem diversas formas de se determinar a concentração nos ejaculados, dentre elas a determinação indireta através do aspecto de densidade (densitometria) ou da absorção de luz (fotometria) e métodos diretos, como a contagem de células individuais em câmara de volume conhecido (citometria) (DOUGLAS-HAMILTON et al., 2005).

A escolha do método de avaliação da concentração espermática depende de cada CPS (BORTOLOZZO et al., 2005b), sendo a forma direta com o uso da câmara hemocitométrica (Neubauer, Thoma ou Bürker) a técnica de maior confiabilidade e precisão (VIANNA et al., 2004), quando corretamente executada. No entanto, a mesma não é utilizada rotineiramente em centrais de IA, uma vez que é demorada e necessita de mão de obra mais especializada. Logo, o espectrofotômetro é o método mais frequentemente observado (HANSEN et al., 2002). Baseado no grau de absorbância de luz, este é um procedimento fácil e rápido para a utilização rotineira na determinação da concentração. Infelizmente, este tipo de contagem pode apresentar a desvantagem de sub ou superestimar o número de espermatozoides caso a calibragem do aparelho

esteja inadequada. Além disso, a presença de partículas no sêmen e diferença entre o plasma seminal podem alterar o valor da concentração espermática.

O espermiodensímetro, que é baseado no grau de turbidez do ejaculado, apresenta vantagens em relação às técnicas citadas, dentre elas um menor custo, maior praticidade e rapidez. Esse método pode ser uma opção interessante para centrais de pequeno porte, casos em que não existem recursos para a aquisição de um espectrofotômetro e a mão de obra não é suficientemente qualificada (BORTOLOZZO et al., 2005b). No entanto, deve-se ressaltar que esta técnica tende a superestimar a concentração em relação à câmara de hemocitométrica, levando à produção de doses menos concentradas, tendo, como consequência, problemas de fertilização (VIANNA et al., 2004).

A maioria dos sistemas CASA, além da motilidade, também possuem a capacidade de realizar o exame da concentração espermática na mesma amostra avaliada. Essa avaliação é possível através da captação de imagens digitalizadas e contagem dos espermatozoides contidos na imagem (VERSTEGEN et al., 2002). Por ser um método objetivo e preciso, a contagem eletrônica através do sistema CASA pode proporcionar, quando bem padronizado, a produção uniforme de doses inseminantes (HANSEN et al., 2006). Para a maior confiabilidade dos resultados, é necessário que a dose seja avaliada em câmaras de contagem disponíveis para esta função.

2.2.3 Sistema CASA

Os métodos convencionais de análise do sêmen se baseiam em técnicas bastante subjetivas, utilizando uma estimativa visual dos parâmetros relacionados à qualidade espermática. Estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (JØRGENSEN et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002). Isto posto, na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen, os sistemas CASA vêm sendo desenvolvidos, fornecendo confiabilidade e velocidade de obtenção dos dados.

O sistema CASA é um conjunto de equipamentos e softwares utilizado para visualizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações precisas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004). O primeiro sistema que permitia a transferência direta de vídeo a partir de um microscópio,

seguido por um processamento automático de imagens e saída de dados, foi descrito por KATZ et al. em 1985. Nos últimos anos, relatos utilizando o instrumento têm aumentado significativamente e, atualmente, existem mais de 12 sistemas CASA comercializados, em diversos lugares no mundo, para a avaliação de sêmen animal (AMANN; WABERSKI, 2014).

Embora possa haver variações entre os diferentes fabricantes em termos da óptica e do software utilizados, todos os sistemas CASA consistem em uma câmera de vídeo de alta resolução acoplada a um microscópio, que envia as imagens obtidas para um computador (KRAEMER et al., 1998). Ainda, para a identificação do espermatozoide, a maioria dos modelos existentes estabelece um centroide, geralmente a cabeça, para cada célula espermática e avalia o movimento individual do espermatozoide baseado na trajetória desse ponto. A trajetória é reconstruída a partir da posição do centroide nas sucessivas imagens que o sistema capta e digitaliza (Figura 1; AMANN; WABERSKI, 2014). Através dessas informações, o sistema identifica os diferentes padrões do movimento espermático (parâmetros cinemáticos) e, por meio de algoritmos de processamento de imagem, as propriedades desses movimentos são analisadas (VERSTEGEN et al., 2002).

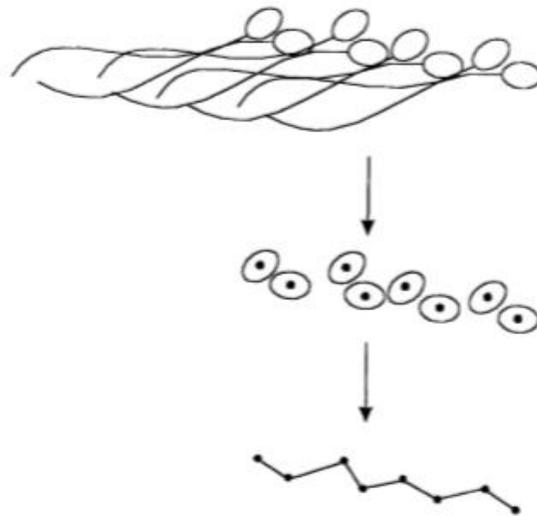


Figura 1 - Reconstrução da trajetória espermática. (Fonte: MORTIMOR, 2000)

Para diferenciar os padrões de cinemática celular, o sistema CASA considera, entre outras características, a trajetória e a direção do movimento espermático, a velocidade, a amplitude do deslocamento da cabeça do espermatozoide e a frequência com que a cabeça do espermatozoide muda de direção (MORTIMOR 2000; SERRES et al, 1984). Dessa forma,

além das informações de deslocamentos e das motilidades total, progressiva, rápida, lenta, circular e local, o equipamento também fornece detalhes sobre a velocidade curvilínea, a amplitude do movimento lateral da cabeça, frequência de batimento cruzado, velocidade média percorrida, velocidade em linha reta, retilinearidade, linearidade e o coeficiente de oscilação (Tabela 1; VERSTEGEN et al., 2002).

Tabela 1 - Parâmetros de cinemática celular medidas pelo sistema CASA

Parâmetro	Sigla	Unidade	Descrição
Deslocamento curvilíneo	DCL	μm	Distância percorrida do traçado curvilíneo
Deslocamento linear	DSL	μm	Distância percorrida do traçado em linha reta, em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória
Deslocamento médio	DAP	μm	Distância percorrida do traçado médio
Velocidade curvilínea	VCL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade do traçado curvilíneo
Velocidade linear	VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade do traçado em linha reta
Velocidade da trajetória média	VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidade do traçado médio
Linearidade	LIN		Relação entre VSL e VCL
Retilinearidade	STR		Relação entre VSL e VAP
Wobble	WOB		Coefficiente de oscilação. Relação entre VAP e VCL
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça	ALH	$\mu\text{m/s}$	Deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em relação ao traçado médio
Frequência de batimento cruzado	BCF	Hz	Frequência com que o traçado curvilíneo cruza o traçado médio

Nos últimos anos, o sistema CASA tem mostrado ser um válido recurso na avaliação da qualidade espermática do ejaculado, mostrando grande potencial para prever a fertilidade do macho (COX et al., 2006). Na tentativa de correlacionar os parâmetros de motilidade do CASA com índices reprodutivos, um estudo recente (BROEKHUIJSE et al., 2012) demonstrou que a motilidade progressiva, a VCL e a BCF possuem efeito significativo na taxa de parto, e que a motilidade total, VAP, VSL e ALH, por sua vez, influenciam o número de leitões nascidos na leitegada. Já VYT et al. (2008) demonstraram uma relação positiva entre a percentagem de espermatozoides móveis, conforme determinado pelo CASA, e o tamanho da leitegada.

2.2.4 Morfologia

A avaliação da morfologia espermática é uma ferramenta efetiva na estimativa do funcionamento das células do epitélio seminífero e da maturação do epidídimo, servindo, portanto, como uma maneira adicional de aferir a qualidade do ejaculado e o potencial de fertilização (GADEA, 2005). Um percentual elevado de células anormais pode resultar em baixas taxas de prenhez e reduzido tamanho de leitegada (ALM et al., 2006; TSAKMAKIDIS et al., 2010). Em um estudo recente, MCPHERSON et al (2014) determinaram que conforme a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal no sêmen aumenta em 1%, o número de leitões nascidos vivos aumenta em 0,025. Logo, um exame morfológico completo é extremamente recomendado quando os reprodutores são introduzidos no rebanho e durante os exames de rotina regulares subsequentes.

Usualmente, a avaliação morfológica do sêmen suíno compreende uma classificação qualitativa e quantitativa das estruturas normais e anormais do espermatozoide (BONET et al., 2013). No exame são contadas 200 células espermáticas por amostra de sêmen no microscópico de contraste de fase, com aumento de 1000x e óleo de imersão. As amostras podem ser obtidas através: de esfregaço de espermatozoides em lâmina corados com eosina-nigrosina ou com azul de Trypan e Giemsa, ou de preparação úmida (amostra fixada de espermatozoides em formol citrato entre lâmina e lamínula) (FOXCROFT et al., 2008). O ejaculado de machos saudáveis sempre abriga uma certa proporção de espermatozoides morfolologicamente anormais. No entanto, as perturbações na capacidade de fertilização são apenas esperadas de animais que possuem um número de células defeituosas além dos limites aceitáveis (SCHULZE et al. 2014). De acordo com o manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013), as características

desejáveis para dose de sêmen refrigerado são de até 5% de alterações de cabeça; 5% de cauda; 5% de acrossoma; 5% de peça intermediária; 10% de gota citoplasmática proximal e 20% de total geral de alterações.

As alterações morfológicas podem ser um indicativo da ocorrência de processos patológicos que afetam os testículos e/ou o epidídimo ou ainda de problemas de manipulação incorreta do ejaculado na sala de coleta e/ou laboratório (BORTOLOZZO et al., 2005b). As alterações mais comuns estão relacionadas à cauda e à gota citoplasmática (WABERSKI et al., 1994). A maioria das alterações de cauda está associada à predisposições genéticas e ocorre durante o desenvolvimento do espermatozoide. Todavia, deve-se considerar também a influência de condições ambientais adversas como flutuações de temperatura e alterações de pH ou osmolaridade na ocorrência dessa anormalidade. As gotas citoplasmáticas, quando presentes, podem indicar problemas na maturação da célula espermática, causada, por exemplo, por uma alta frequência de ejaculação (FLOWERS, 2004). Já as alterações de cabeça, embora mais raras, são bastante severas, pois limitam a ligação do espermatozoide ao oócito no momento da fecundação (FLOWERS, 2004). Reprodutores suínos com um percentual elevado de cabeças anormais (35%) têm em média menos 1,6 leitões nascidos quando comparados com reprodutores que possuem uma percentagem mínima desse tipo de defeito (MCPHERSON et al., 2014).

2.2.4.1 Integridade do Acrossoma

A membrana acrossômica cobre dois terços da parte superior da cabeça do espermatozoide e contém as enzimas acrosina e hialuronidase, essenciais ao processo de penetração dos oócitos (BONET et al., 2013). Assim, o acrossoma é a parte fundamental da célula espermática. Qualquer degeneração, má formação ou dano causado ao acrossoma podem inibir a capacidade fecundante do espermatozoide.

Os defeitos na região ocorrem principalmente devido a fatores como envelhecimento, rápido decréscimo da temperatura, congelamento/descongelamento, indicando que as causas são, na maioria das vezes, de natureza exógena. Dependendo da quantidade de anormalidades, pode haver uma redução do potencial de fertilidade do sêmen. GADEA et al. (1998) observaram que o percentual de acrossomas intactos foi correlacionado com o tamanho da leitegada e maior percentual de acrossomas intactos foi observado no grupo de ejaculados de alta fertilidade em comparação aos de baixa fertilidade. Da mesma forma, FAZELI et al. (1997) demonstraram que

apenas espermatozoides com acrossomas normais são capazes de fecundar a zona pelúcida na espécie suína.

2.3 Armazenamento de Doses Inseminantes

O espermatozoide suíno apresenta muita sensibilidade, tanto ao envelhecimento, quanto ao choque térmico, devido à fragilidade do seu acrossoma. Assim, devido ao impacto que a qualidade das doses tem sobre a fertilidade do rebanho, é fundamental que o processamento e armazenamento das mesmas sejam realizados de forma adequada, a fim de maximizar a sobrevivência e viabilidade das células espermáticas. De maneira geral, a conceituação da qualidade do sêmen suíno após a conservação reside no número de espermatozoides com integridade de acrossoma e no percentual de formas dotadas de motilidade.

2.3.1 Tempo e Temperatura de Armazenamento

O sêmen suíno, dentre outras espécies de mamíferos, é o mais sensível a flutuações térmicas (BOUCHARD et al., 1990). A temperatura ideal para a manutenção das doses inseminantes situa-se entre 15 e 18 °C. Um resfriamento inferior a 15 °C resulta em uma diminuição da taxa de sobrevivência espermática. Esse fenômeno é atribuído a alterações estruturais e bioquímicas que levam à ruptura da membrana plasmática e à degeneração do acrossoma (BORTOLOZZO et al., 2005b). Temperaturas acima dos 18 °C, por outro lado, são prejudiciais por não reduzirem de forma eficiente o metabolismo dos espermatozoides e por não impedirem a multiplicação bacteriana, o que pode influenciar a qualidade espermática e o período de armazenamento (KATZER et al., 2001; SCHEID, 2003; WEITZE; 1990).

A resistência dos espermatozoides ao choque térmico difere entre as várias espécies. As diferenças podem estar relacionadas à composição química e molecular das membranas plasmática e mitocondrial, especialmente os ácidos graxos e fosfolipídios (POULOS et al., 1973). O espermatozoide suíno, em comparação ao bovino, possui menor proporção colesterol/fosfolipídio e uma distribuição assimétrica de colesterol dentro da membrana, tornando-a muito susceptível a temperaturas baixas (JOHNSON et al., 2000; DE LEEUW et al., 1990). Logo, em contraste com o sêmen bovino, o sêmen suíno congelado ainda apresenta uma fertilidade inferior à do sêmen resfriado (PAQUIGNON et al., 1987).

O resfriamento das doses inseminantes (15-18°C) tem como objetivo prolongar a viabilidade dos espermatozoides ejaculados, através da desaceleração dos processos metabólicos celulares. Assim, ocorre uma redução significativa do consumo de energia e da formação de substâncias tóxicas (ALTHOUSE et al., 1998). Todavia, para que o resfriamento do sêmen possa ser viabilizado, também é fundamental a utilização de diluentes capazes de permitir a sobrevivência espermática, mantendo elevada a capacidade de fertilização. Essas substâncias possuem duas funções básicas: prolongar a vida do espermatozoide e aumentar o volume do ejaculado. Além disso, o diluente ainda é responsável pelo fornecimento de um meio nutritivo para o espermatozoide, pela manutenção do pH do meio e pelo controle do crescimento bacteriano durante o armazenamento.

Os diluentes utilizados na IA podem ser classificados com base no período de manutenção da viabilidade e capacidade fecundante do espermatozoide (LEVIS, 2000). Os diluentes de longa duração prolongam a vida dos espermatozoides por cinco dias ou mais e podem ser usados quando o sêmen é armazenado por períodos maiores ou transportado por longas distâncias, tendo como exemplos para a espécie suína os diluentes Androhep e Reading. Já os de curta duração preservam a célula espermática por até três dias, como os diluentes BTS e KIEV. Assim, a escolha do meio diluente deve considerar as condições em que a inseminação artificial irá ocorrer, o tempo que normalmente decorre entre o processamento das doses e a inseminação artificial, ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou armazenamento durante alguns dias (BORTOLOZZO et al., 2005b).

Sob o ponto de vista fisiológico, a diminuição da capacidade fecundante devido ao envelhecimento celular é um fenômeno natural e não pode ser prevenido. Ou seja, com o passar do tempo, os espermatozoides, inevitavelmente, irão sofrer mudanças funcionais e estruturais que podem afetar sua sobrevivência (JOHNSON et al., 2000). Entretanto, através do uso de diluentes de longa ação, o envelhecimento das células espermáticas pode ser retardado. Além disso, um processamento e armazenamento adequado das doses podem também minimizar o efeito negativo do armazenamento (WEITZE, 1991). KUSTER; ALTHOUSE (1999), ao pesquisarem o efeito do período de armazenamento do sêmen sobre a taxa de parição e o tamanho de leitegada, evidenciaram que a duração da viabilidade da dose inseminante está na dependência da utilização de sêmen com alta qualidade, a qual, portanto, deve ser mantida desde a coleta até o momento da inseminação artificial.

2.3.2 Presença do ar durante o armazenamento

Conforme citado anteriormente, a qualidade das doses refrigeradas pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a temperatura das conservadoras, o tempo de armazenamento e o tipo de diluente utilizado (RODRÍGUEZ-GIL; RIGAU, 1995). Outro fator que poderia afetar a função espermática é o ar. No entanto, estudos que investiguem a relação dessas duas variáveis ainda são escassos na literatura. Teoricamente, a manutenção do ar no interior das embalagens durante o período de armazenamento é indesejável. Assim, alguns autores recomendam que, no momento do envase, o volume do recipiente seja completamente preenchido por sêmen diluído, a fim de garantir a maior durabilidade das doses inseminantes (AUSEJO et al., 2015)

A retirada do ar das doses, todavia, não é uma prática amplamente difundida e padronizada em centrais de inseminação artificial (VYT et al., 2007). Isso pode ser explicado, em parte, pela carência de embalagens específicas para um determinado volume. Consequentemente, pode haver a formação de uma câmara de ar caso a capacidade da embalagem seja superior à quantidade de sêmen diluído. Destaca-se nesse caso a situação da inseminação artificial intrauterina, onde a redução no volume da dose inseminante (45-50 mL), em relação à inseminação tradicional (80-90 mL), não foi acompanhada, na maioria das centrais, por uma diminuição no tamanho das embalagens. Geralmente, em CPS que produzem os dois tipos de doses, o mesmo tipo de embalagem é utilizado.

O efeito negativo da presença do ar durante o armazenamento teria relação com capacidade que o mesmo possui de alterar o potencial hidrogeniônico (pH) da dose inseminante. O pH do sêmen da espécie suína é levemente alcalino, estando em torno de 7,3 a 7,9 (HAFEZ, 1993). Contudo, em contato com o ar, o pH do meio se tornaria ainda mais básico, prejudicando a qualidade espermática. VYT et al. (2007) observaram uma diferença significativa nos parâmetros de motilidade em amostras de sêmen armazenadas na presença de diferentes quantidades de ar. A porcentagem de espermatozoides móveis foi menor e o pH mais elevado em doses que possuíam uma proporção maior de ar.

Recentemente, AUSEJO et al. (2015) concluíram que o efeito prejudicial do ar também poderia estar relacionado ao estresse oxidativo. Os fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide suíno apresentam uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados, tornando-os altamente sensíveis ao efeito desta reação. Em contato com o ar, os espermatozoides utilizam o oxigênio disponível para a produção de energia através da respiração aeróbica (PIPAN et al.,

2014). Desse modo, visto que os radicais livres são formados a partir do metabolismo do oxigênio, a presença do ar nas doses teria a capacidade de aumentar a produção desses compostos, levando a perdas na função espermática.

3. ARTIGO: INFLUÊNCIA DO AR NA QUALIDADE DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS A 17 °C

3.1 Introdução

A inseminação artificial tornou-se uma prática padrão na suinocultura tecnificada e desempenha um papel fundamental na performance reprodutiva do plantel. Atualmente, mais de 90% da IA na produção de suínos ao redor do mundo é realizada com o uso de diluentes que garantem um período viável das doses por até 5 dias de armazenamento a uma temperatura de 15 a 18°C (JOHNSON et al., 2000). Um dos principais objetivos das Centrais de Processamento de Sêmen (CPS) é produzir doses inseminantes de alta qualidade através da combinação de um manejo adequado, da manipulação correta do sêmen e dos aspectos que envolvem o bem estar do reprodutor, incluindo condições sanitárias ideais.

A qualidade das doses refrigeradas pode ser influenciada por diversos fatores que interagem e interferem na célula espermática, incluindo a temperatura das conservadoras, o tempo de armazenamento e o tipo de diluente utilizado (RODRÍGUEZ-GIL; RIGAU, 1995). Outro fator que poderia afetar a função espermática é a presença de ar na dose. Teoricamente, a manutenção do oxigênio no interior das embalagens durante o período de armazenamento é indesejável. Assim, alguns autores recomendam que, no momento do envase, o volume do recipiente seja completamente preenchido, a fim de garantir a maior durabilidade das doses inseminantes (AUSEJO et al., 2015). Esse procedimento, todavia, não amplamente difundido e padronizado em centrais de inseminação artificial (VYT et al., 2007).

O presente estudo, portanto, consistiu em avaliar a influência da quantidade de ar presente na qualidade de doses de sêmen suíno durante o período de armazenamento. O estudo comparou amostras de sêmen armazenadas em embalagens contendo diferentes quantidades de ar durante um período total de 120 horas. Desse modo, o projeto teve como objetivo encontrar respostas que possam auxiliar nas práticas de envase e armazenamento das doses, e assim minimizar fatores que possam prejudicar a qualidade espermática.

3.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido na Granja Experimental e no Laboratório de Reprodução do Setor de Suínos, na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

durante os meses de outubro e novembro de 2015. Para a realização do experimento foram utilizados, como doadores de sêmen, cinco machos suínos adultos, sexualmente maduros, submetidos ao manejo de coleta a cada 5 a 7 dias. De cada reprodutor, foram utilizados 4 ejaculados, cada qual processado e distribuído em *split sample* em três tratamentos, diferindo na quantidade de sêmen diluído e na quantidade de ar ambiente retido no interior das embalagens. No tratamento T0, as embalagens continham 100% de sêmen diluído e 0% de ar, enquanto que o T25 continha 75% de sêmen diluído e 25% de ar e o T50, 50% de sêmen diluído e 50% de ar ambiente.

A coleta de sêmen foi realizada pela técnica da mão enluvada. Após a coleta, o ejaculado foi avaliado macroscopicamente (cor, odor e aspecto) e imediatamente analisado. As análises de motilidade e concentração foram feitas pelo sistema CASA (AndroVision[®], 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 diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) e envasadas em bisnagas plásticas, as quais possuíam uma capacidade de 100 mL. O volume de sêmen diluído depositado em cada bisnaga foi criteriosamente pesado em uma balança de alta precisão (Shimadzu[®] BL3200H, São Paulo, Brasil) e variou de acordo com cada tratamento. O T0 continha 100 mL de sêmen diluído, enquanto que T25 e T50 continham, respectivamente, 75 mL e 50 mL. As doses foram diluídas a fim de conter aproximadamente 30 milhões/mL de espermatozoides e permaneceram durante 90 minutos em temperatura ambiente do laboratório, a qual era mantida entre 20 e 22 °C, para estabilização.

Após a estabilização, as doses de sêmen foram mantidas sob resfriamento ($17,3 \pm 0,5$ °C) por um período total de 120 horas. Durante esse período, as doses foram submetidas à agitação leve, uma vez ao dia, para a ressuspensão das células espermáticas. Para cada conjunto de análises (motilidade, morfologia e pH), a mesma dose era utilizada e, posteriormente, descartada. Dessa forma, cada bisnaga foi aberta somente no momento anterior à sua avaliação, mantendo assim, o perfil de ar dos diferentes tratamentos durante todo o período de armazenamento.

As análises de motilidade das doses foram realizadas no sistema CASA em quatro momentos distintos após a diluição final: 24, 72 e 120 horas. Para a avaliação, uma alíquota de 1

mL de cada dose foi aquecida a 37 °C por 10 minutos. A câmara de contagem foi preenchida por capilaridade com 3 µL de sêmen diluído. Todos os materiais que entraram em contato com as células espermáticas também estavam previamente aquecidos a 37°C. As características de motilidade avaliadas no sistema CASA foram: motilidade total; motilidade progressiva; motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade circular; motilidade local; 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 do traçado curvilíneo; DSL - distância percorrida do traçado em linha reta; VAP - velocidade percorrida do traçado médio; VCL - velocidade percorrida do traçado em linha curvilínea; VSL - velocidade percorrida do traçado em linha reta; linearidade (VSL/VCL); STR (Retilinearidade) - VSL/VAP; WOB (Wobble) - VAP/VCL.

Teste de termorresistência foi realizado nas doses com 120 horas, incubando uma alíquota de 10 mL a 38 °C em banho-maria. A avaliação da motilidade espermática foi realizada após 30 e 120 minutos de incubação, usando o sistema CASA de acordo com métodos descritos anteriormente.

A avaliação da morfologia espermática foi realizada do sêmen *in natura* e das doses com 72 e 120 horas de armazenamento, com o uso de microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, analisando 200 células espermáticas por amostra. Para as doses armazenadas, foi realizada apenas a contagem de defeitos de acrossoma, expresso como percentagem de células espermáticas com acrossoma anormal.

A aferição do pH foi realizada após a diluição (h0) e nas doses armazenadas 24, 48, 72 e 120 horas após o processamento. Para tal procedimento, foi utilizado um pH-metro de indicação digital (QUIMIS® Q400AS, São Paulo, Brasil) previamente calibrado, segundo as instruções do fabricante.

3.3 Resultados e Discussão

O pH das doses de sêmen foi influenciado significativamente pela quantidade de ar presente no interior das embalagens durante o período de armazenamento ($P < 0,05$), sendo que o valor médio desse parâmetro para os tratamentos T0, T25 e T50 foi de $7,07 \pm 0,06$, $7,25 \pm 0,06$ e $7,51 \pm 0,06$, respectivamente (Figura 1). Sob condições normais de armazenamento, o diluente BTS, utilizado neste estudo, deveria fornecer às doses um pH em torno 7,2 (GADEA, 2003).

Entretanto, especula-se que o gradiente formado entre a câmara de ar e o sêmen diluído seja capaz de promover a perda de CO₂ do meio líquido e promover, assim, a alcalinização da dose inseminante (VYT et al., 2007). Já foi demonstrado que a adição de CO₂ às doses de sêmen impede a ocorrência de mudanças no pH do meio, indicando, então, que este componente desempenha um papel essencial na manutenção das características iônicas do sêmen diluído (VYT et al., 2007).

Os dados de motilidade espermática estão apresentados na Figura 2. Houve interação ($P < 0,05$) entre os tratamentos e o momento de avaliação do sêmen para as variáveis motilidade total, motilidade progressiva e motilidade rápida. No último dia de armazenamento (h120), o desempenho foi superior nas doses que tiveram, no momento do envase, o volume da embalagem completamente preenchido com sêmen diluído (T0) em comparação com doses com 50% de ar no interior das bisnagas (T50). A motilidade rápida apresentou o mesmo comportamento já no terceiro dia após a diluição final (h72). Em relação à motilidade circular, a mesma foi influenciada pelo tratamento empregado, sendo superior em T0 ($P < 0,05$) quando comparado com T25 e T50 (1,3, 0,8 e 0,8 $\mu\text{m/s}$, respectivamente).

O pH intracelular do espermatozoide é diretamente relacionado ao pH do meio em que o mesmo se encontra. Consequentemente, alterações no meio são capazes de influenciar significativamente a qualidade espermática (GATTI et al., 1993). Desse modo, infere-se que as diferenças de pH observadas no presente estudo influenciaram os parâmetros de motilidade, resultando nas alterações recém citadas. Estudos prévios também demonstraram que doses que continham um maior volume de ar e, por conseguinte um pH mais elevado, tiveram uma menor proporção de espermatozoides com motilidade total e progressiva, 60 horas após a coleta (VYT et al., 2007). Similarmente, JONES; BAVISTER (2000) observaram um relação inversa entre o pH e a motilidade espermática, demonstrando, dessa maneira, a relação direta do pH externo com o metabolismo do espermatozoide. Além do pH, efeito prejudicial do ar também poderia estar relacionado ao estresse oxidativo (AUSEJO et al., 2015). Os fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide suíno apresentam uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados, tornando-os altamente sensíveis ao efeito desta reação. Em contato com o ar, os espermatozoides utilizam o oxigênio disponível para a produção de energia através da respiração aeróbica (PIPAN et al., 2014). Desse modo, visto que os radicais livres são formados a partir do

metabolismo do oxigênio, a presença do ar nas doses teria a capacidade de aumentar a produção desses compostos, levando a perdas na função espermática.

A integridade do acrossoma não foi influenciada pelas diferentes quantidades de ar. Foi observada, no entanto, uma diferença significativa ($P < 0,0001$) na porcentagem média de acrossomas danificados entre os diferentes momentos de análise, sendo superior nas 120 horas de armazenamento em relação às 72 horas (4,53 vs 3,31, respectivamente). Da mesma forma, para variáveis motilidade lenta e local verificou-se apenas o efeito do momento em que foi realizada a avaliação. O efeito do momento na qualidade das doses reflete as consequências do envelhecimento celular, sendo este um fenômeno natural que não pode ser prevenido (JOHNSON et al., 2000). Durante o período de armazenamento, ocorrem mudanças funcionais e estruturais nos espermatozoides, reduzindo a capacidade de fecundação dos mesmos e afetando a qualidade da dose espermática (JOHNSON et al., 2000; WABERSKI, 1994).

No teste de termorresistência, os principais parâmetros de motilidade foram influenciados pelos diferentes tratamentos (Tabela 1). A motilidade total, a motilidade progressiva e a motilidade rápida tiveram um melhor desempenho em T0 em comparação com T50 e T25. Em relação à motilidade lenta, menores valores foram encontrados em doses contendo 50% de ar (T50) quando comparadas com doses armazenadas sem a presença do ar (T0). Em um trabalho recente, SCHULZE et al (2015) observaram que amostras de sêmen, em ambiente alcalino (pH 7,3-7,5) sofreram perda de motilidade e alterações nos padrões de cinética espermática quando submetidas a um teste de termorresistência prolongado (300 min a 38 °C), deixando evidente o efeito negativo do pH na longevidade da célula espermática. Adicionalmente, o presente estudo encontrou que todos os parâmetros analisados, incluindo as motilidades lenta e circular, foram dependentes do tempo de incubação a 38 °C. De uma maneira geral, as amostras avaliadas após 30 minutos de incubação apresentaram um desempenho superior às avaliadas após 120 minutos. Segundo HARRISON; VICKERS (1990), o efeito negativo do tempo de incubação está correlacionado com a perda de componentes intracelulares ou lesões estruturais na cauda dos espermatozoides ocorridas durante o desafio do teste de termorresistência.

Na rotina de laboratórios comerciais, com o uso de doses para inseminação pós-cervical, o volume da dose foi reduzido de 80-90 para 45-50 mL. Entretanto, muitas CPS utilizam a mesma embalagem plástica para a produção de ambos os volumes de dose, aumentando com isso a

câmara de ar presente na dose. Embora o efeito na motilidade espermática tenha sido evidente apenas no final do período de armazenamento, alterações no pH, provocadas pela quantidade de ar, foram observadas já no primeiro momento de análise, mostrando que o meio no qual os espermatozoides se encontram é alterado. Conforme as células sofrem desafios de temperatura (pelo teste de termorresistência) ou de armazenamento (até 120 horas), as diferenças passaram a ser mais evidentes. Podem ser ainda investigados os efeitos da câmara de ar presente na dose no desempenho a campo das doses, uma vez que além do armazenamento, há ainda o transporte das doses das CPS para as granjas, muitas vezes em condições não ideais, e do desempenho *in vivo*, como taxa de parto e número de leitões nascidos.

3.4 Conclusão

A presença do ar no interior das embalagens afeta o meio no qual os espermatozoides estão suspensos, devido à alcalinização das doses. Entretanto, os parâmetros de motilidade foram afetados no final do período de armazenamento (h120). Assim, recomenda-se que, no momento do envase, o volume do recipiente seja completamente preenchido, a fim de garantir a maior durabilidade das doses inseminantes. Contudo, faz-se necessária a realização de trabalhos que estudem outros parâmetros que podem ser influenciados pela manutenção do oxigênio nas doses.

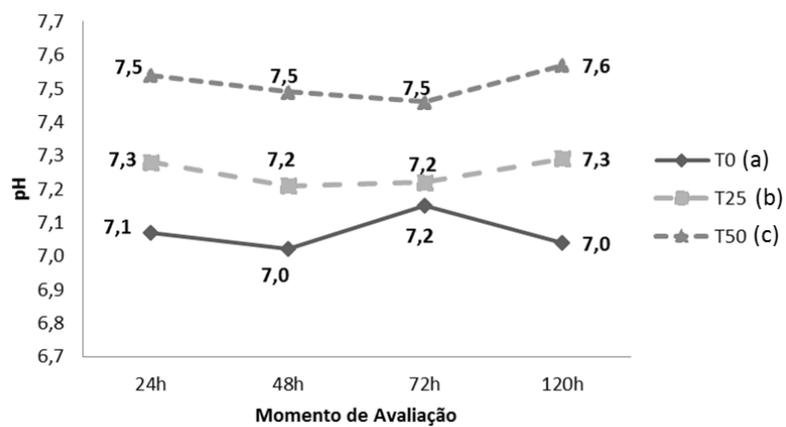


Figura 1 – Perfil de pH de cada tratamento ao longo do armazenamento. Letras entre parênteses indicam diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

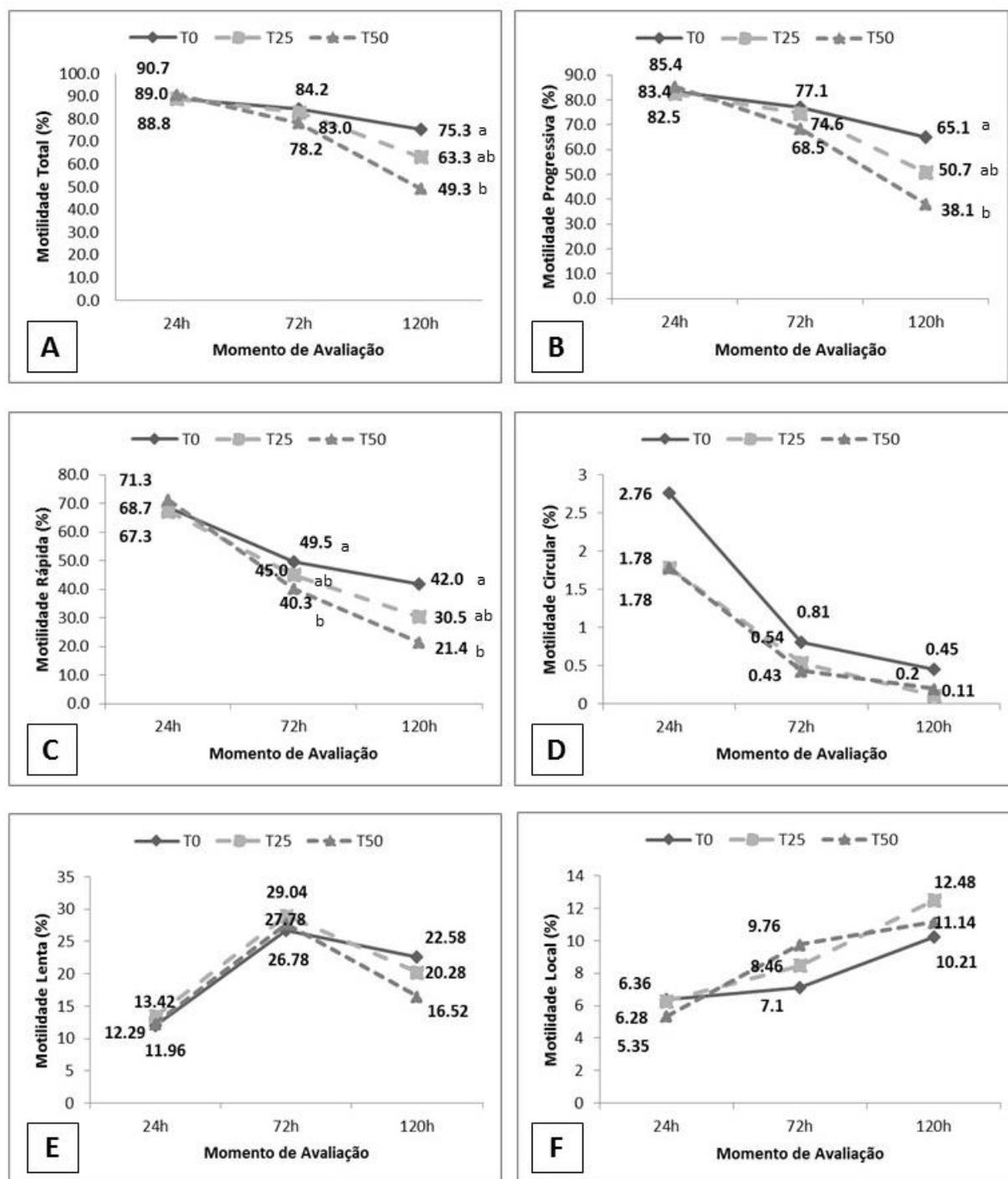


Figura 2 - Parâmetros de motilidade de doses de sêmen de acordo com o tempo de armazenamento e o tratamento. Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos dentro do momento de avaliação.

Tabela 1 - Valor médio dos parâmetros de motilidade espermática de amostras de sêmen analisadas após 30 e 120 minutos de incubação a 38 °C (teste de termorresistência).

	Tratamento			Erro padrão
	T0	T25	T50	
		30 minutos		
Motilidade Total	62,47 ^a	51,50 ^b	42,07 ^b	9,03
Motilidade Progressiva	49,98 ^a	38,09 ^b	29,62 ^b	8,29
Motilidade Rápida	28,22 ^a	18,45 ^b	13,82 ^b	4,69
Motilidade Lenta	21,60 ^a	19,49 ^{ab}	15,68 ^b	3,84
Motilidade Circular	0,16	0,15	0,13	0,08
Motilidade Local	12,49	13,42	12,45	1,26
		120 minutos		
Motilidade Total	27,06 ^a	21,44 ^b	15,29 ^b	8,64
Motilidade Progressiva	20,50 ^a	14,25 ^b	9,03 ^b	7,86
Motilidade Rápida	10,74 ^a	7,12 ^b	4,14 ^b	4,19
Motilidade Lenta	9,71 ^a	7,03 ^{ab}	4,83 ^b	3,69
Motilidade Circular	0,06	0,10	0,05	0,07
Motilidade Local	6,55	7,19	6,27	1,09

Houve efeito do tempo de incubação (30 min vs 120 min) para todas as variáveis. Letras sobrescritas diferem entre os tratamentos (P<0,05).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A retirada do ar das doses não é uma prática amplamente difundida e padronizada em Centrais de Processamento de Sêmen. No entanto, de acordo com os resultados encontrados no presente experimento, a presença do ar no interior das embalagens utilizadas para o armazenamento do sêmen suíno prejudica a qualidade das doses inseminantes. Foi observado que doses contendo altas quantidades de ar tiveram um pH mais elevado e um desempenho inferior em alguns parâmetros de motilidade espermática. O trabalho também sugere que a qualidade das doses de sêmen está relacionada com a duração do período de armazenamento, visto que a motilidade dos espermatozoides diminuiu com o passar do tempo. Desse modo, com o objetivo de garantir uma maior durabilidade das doses, recomenda-se a elaboração de protocolos que exijam que, no momento do envase, o volume das embalagens seja completamente preenchido. Contudo, mais estudos devem ser realizados para o completo entendimento do papel do ar na qualidade espermática.

5. REFERÊNCIAS

ABIPECS. 2013. Disponível em: <<http://famasul.com.br>>. Acessado em 09/2015

ALEXOPOULOS, C.; BOSCOS, C.; SARATSI, C. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville Thaw Solution (BTS) extender. **Animal Science**, 62(3): p.599-604, 1996

ALM, K.; PELTONIEMI, O.A.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M.; Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reprod.Domest.Anim.** 41. p. 210-213, 2006.

ALTHOUSE, C.G.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v.50, p.535-543, 1998.

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**,v. 25, p.317-325, 2004.

AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology** 81, p.5–17, 2014.

AUSEJO, R.; Y. D. Effect of an air chamber in stored boar seminal doses. VIIIth International Conference on Boar Semen Preservation (p. 124). Champaign, Illinois, USA: **Reprod Dom Anim** 50 (Suppl. 2), 119–128 (2015); doi: 10.1111/rda.12578, 2015.

- BALTES, T.J. Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of in vitro aging of boar spermatozoa. 102p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Hannover, Alemanha, 1993.
- BERNARDI, M.L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**. 36 (Supl 1): s5-s16, 2008.
- BONET S., I. C.; CASAS, I.; HOLT, W. V.; YESTE, M. Boar Reproduction: Fundamentals and New **Biotechnological Trends**. Springer, 2013.
- BORTOLOZZO FP, WENTZ I, DANORA D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **ActaSci Vet**, v.33, suppl.1, p.17-32, 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, 2011.
- BROEKHUIJSE, M.L.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center: a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology** 77, 1466– 1479, 2012.
- CBRA. Exame andrológico e padrões de qualidade seminal em suínos / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. – Belo Horizonte: **CBRA**, 2013, 49p, 2013.
- COLENBRANDER, B.; KEMP, B. Factors influencing semen quality in boars. **J. Reprod. Fertil.** Suppl., 40, pp. 105–115, 1990.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860-867, 2006.
- DE LEEUW, F.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, p.95-104, 1990.
- DONALD, T.S.; HICKMAN, R.; HOSKINS, D.D. Description, validation and performance characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biol Reprod**, v.38, p.577-586, 1988.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; SMITH, N.G.; KUSTER, C.E.; VERMEIDEN, J.P.W. and ALTHOUSE, G.C. Particle distribution in low-volume capillaryloaded chambers. **J. Androl.**, 26: 107-114, 2005.

- FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.L.; TARDIF, A.L.. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **J Androl**, v.17, p.293-300, 1996.
- FAZELI, A.; HAGE, W.J.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. **Biol Reprod** 56, p.430–438, 1997.
- FLOWERS, W. L. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. **Midwest Boar Stud Conference II**, p. 15 – 22, 2004
- FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, 52, p. 67–78, 1997.
- FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W. T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324 – 1336, 2008.
- GADEA J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology** 63, p.431-444, 2005.
- GADEA, J. Review: Semen extender used in the artificial insemination of swine. **SJAR** 1, p.17-27, 2003.
- GADEA, J.; MATAS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP/assay. **Animal Reproduction Science**. 56: p.95-108, 1998.
- GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I.M.; BARON, F.J.; GARCIA MARTIN, L.J.; GIL, M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **Int J Androl**, v.29, p.553-563, 2006.
- GATTI, J.L.; CHEVRIER, C.; PAQUIGNON, M.; DACHEUX, J.L. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. **J Reprod Fertil** 98, p. 439–449, 1993.
- HAFEZ, E.S.E. Semen evaluation. In: Hafez E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 6 ed. Lea e Febier. Filadélfia. p. 405-423. 1993.
- HANSEN, C. Comparison of FACSCCount AF system, improved Neubauer 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.
- HANSEN, C.; CHRISTENSEN, P.; STRYHN, H.; HEDEBOE, A.M.; RODE, M. AND BOE-HANSEN, G. Validation of the FACSCCount AF System for determination of sperm concentration in boar semen. **Repr. Domest. Anim.**, 37: p.330-334, 2002.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 88, p.343-352, 1990.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172. 2000.

JONDET R, D.U.; MESNIL, D.U.; BUISSON, F.; SIGNORET, J.P. L'insémination artificielle de la truie. **Rec MédVét**, v.147, p.121-124, 1971.

JONES, J.M.; BAVISTER, B.D. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **J Androl** 21, p. 616–624, 2000.

JØRGENSEN, N.; AUGER, J.; GIWERCMAN, A. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. **Int. J. Androl.**, 20, p.201–208, 1997.

KATZ, D.F., DAVIS, R.O. Automatic analysis of human sperm motion. **J Androl.** 8:p.170–181, 1987.

KATZ, D.F.; DAVIS, R.O.; DELANDMETER, B.A.; OVERSTREET, J.W. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. **Comp Meth Prog Biomed.** 21:p.173–82, 1985.

KATZER, L.H. Resfriamento de sêmen suíno: efeito da temperatura de armazenamento, incubação prévia, taxa de resfriamento e diluentes. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 70p. 2002.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; SILVA, L.E.; SCHWARZ, P.; CARDOSO, M.; BORTOLOZZO, F.P.; PADILHA, A.P.; WENTZ, IVO. Comportamento de populações bacterianas presentes no sêmen suíno resfriado em diferentes temperaturas. In: **Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas Em Suínos**. 10., 2001, Porto Alegre-RS. Anais... Porto Alegre, v.2, p.247-248. 2001.

KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B.; AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Hum Reprod**, v.13, p.611-619, 1998.

KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-Cell™ extenders. **Theriogenology**. v.52, p.365-376. 1999

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: **International Conference on Boar Semen Preservation**. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA. Proceedings. P.121-128, 2000.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G; TONIOLLI R. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008. Disponível em www.cbra.org.br

MCPHERSON, F.J.; NIELSEN, S.G.; CHENOWETH, P.J. Semen effects on insemination outcomes in sows. **Anim Reprod Sci.** 2014 Dec 10;151(1-2):28-33. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.021. Epub, 2014.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. **J Androl**, p.515-524, 2000.

OHATA, P.M. A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno. 81f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2001.

PAQUIGNON, M.; BUSSIERE, J.; BARITEAU, F. Resultats recents en matiere de technologie de la conservation de la semence de verrat. **Journées de la Recherche Porcine en France**, v.19, p.63-78, 1987.

PIPAN, M.Z.; MRKUN, J.; KOSEC, M.; SVETE, A. N.; ZRIMŠEK, P. Superoxide Dismutase: A Predicting Factor for Boar Semen Characteristics for Short-Term Preservation. **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 105280, 7 pages, 2014.

POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L.; Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Anim Reprod Sci** 81, p.97-113, 2004.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehyds of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.4613, p.541-549, 1973.

REIS, G.R.; et al. Identificação de cachacos com diferentes períodos de viabilidade in vitro. In: **Simpósio Internacional Minitub-Inseminação Artificial Em Suínos**. 3., 2000, Flores da Cunha-RS. Anais. P.42-49, 2000.

RIESENBECK A. Review on international trade with boar semen. **Reprod Domest Anim.** 2011 Sep ;46 Suppl 2:1-3. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x, 2011.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Anim.Reprod. Sci.** 39:141-46, 1995.

SATHER, A.P.; HARBISON, D.S.; SETH, P.C. A note on the influence of storage duration of fresh semen on fertilizing capacity and embryo survival in sows. **Animal Production**, v.52, p.554-557. 1991.

SCHEID, I.; et al. Comparação entre diluentes para conservação de sêmen suíno no estado líquido: resultados in vitro. In: **Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**. 6. Goiânia-GO. Anais. p.122. 1993.

SCHEID, I.R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: Development and current use. **ReprodDomestAnim**, v.26, p.299-301, 1991.

- SCHEID, I.R. Transportando e armazenando corretamente as doses de sêmen. **Suíno & Cia**, n.2, p. 25-31, 2003.
- SCHULZE, M.; BUDER, S.; RUDIGER, K.; BEYERBACH, €. M.; WABERSKI, D. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. **Anim Reprod Sci** 148, p.164–170, 2014.
- 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.
- SERRES, C.; FENEUX, D.; JOUANNET, P.; DAVID, G. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. **Gamete Res.** p.183–195, 1984.
- TEJERINA, F.; BURANAAMNUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology** v. 69, p.1129-1138, 2008.
- TSAKMAKIDIS, I.A.; LYMBEROPOULOS, A.G.; KHALIFA, T.A. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. **J.Vet.Sci.** v.11, p.151-154, 2010
- 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 comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. **Rev. Bras. Zootecn.**, v.33: p.2054-2059, 2004.
- VYT, D.; MAES, S.U.; SYS, T RIJSSELAERE, A.; VAN SOOM. Air Contact Influences the pH of Extended Porcine Semen. In: **Reproduction in Domestic Animals** v.42 (2), p.218-220, 2007.
- VYT, P.; MAES, D.; RIJSSELAERE, T.; DELEY, W.; AARTS, M.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift** v.77 p.291-299, 2008
- WABERSKI, D.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A.M. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. **Reprod.Domest.Anim.** v.46, p.45-48, 2011.
- WABERSKI, D.; MEDING, S.; DIRKSAEN, G.; WEITZE, K. F.; LEWIDING, C.; HAHN, R. Fertility of long term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 145–151, 1994.
- WEITZE, K.F. Long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.231-253. 1991.
- WEITZE, K.F. Long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.1, p.231-253. 1991.

WOLF, J.; SMITAL. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. **J. Anim. Sci.**, v.87, p. 1620–1627, 2009.

XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTO, W.; FOXCROFT, G.R.. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **J. Anim. Sci.**, v.76, p. 3079–3089, 1998