

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E USO DE
ANTIMICROBIANOS NA QUALIDADE DE DOSES SEMINAIS DE SUÍNOS**

TILA DE ALCANTARA MENEZES

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E USO DE
ANTIMICROBIANOS NA QUALIDADE DE DOSES SEMINAIS DE SUÍNOS

Autor: Tila de Alcantara Menezes

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução de Suínos

Orientador: Ivo Wentz

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Menezes, Tila de Alcantara
AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E USO
DE ANTIMICROBIANOS NA QUALIDADE DE DOSES SEMINAIS DE
SUÍNOS / Tila de Alcantara Menezes. -- 2018.

60 f.

Orientador: Ivo Wentz.

Coorientadora: Ana Paula Gonçalves Mellagi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. reprodução de suínos. 2. temperatura de
armazenamento. 3. sêmen diluído. 4. bactéria. 5.
mesófilos totais. I. Wentz, Ivo, orient. II.
Mellagi, Ana Paula Gonçalves, coorient. III. Título.

Tila de Alcantara Menezes

**AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E USO DE
ANTIMICROBIANOS NA QUALIDADE DE DOSES SEMINAIS DE SUÍNOS**

Aprovado em 9 de março de 2018.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Ivo Wentz

Orientador e Presidente da Comissão

Prof.^a Dr.^a Enefer Rosana Oberst

Membro da Comissão

Prof.^a Dr.^a Franciele Maboni Siqueira

Membro da Comissão

Prof. Dr. Ivan Bianchi

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que desde o início preparou meu caminho e permitiu que tudo fosse melhor do que eu pedia.

Aos meus pais, Clovis e Dairce, que me conduziram sempre com amor inigualável, confortaram-me nos momentos de desespero e estiveram comigo por toda a trajetória.

Aos familiares de Ribeirão Preto, Ituverava e Uberlândia, por todo apoio concedido.

Às amigas, Carolina, Eloá, Letícia, Maysa, Raphaela, Taísa e Thaís pelos bons e divertidos momentos na volta para casa.

Às amigas que fiz em Porto Alegre, Ana Raquel, Camila, Ligiani e Tatiane pelas conversas, pelos momentos de descontração e pela cumplicidade.

À companheira de casa, Aline Paschoal, pela amizade, pelo carinho, companheirismo e entretenimento, além das ótimas refeições (leia-se, aqui, brigadeiros).

Ao prof. Ivo Wentz, pela oportunidade ímpar de fazer parte da equipe por esses dois anos, pelos ensinamentos transmitidos e pelo apoio fornecido durante o tempo em que estive no Setor de Suínos.

Aos professores Ana Paula Mellagi, Fernando Bortolozzo e Mari Bernardi por toda paciência, pelo conhecimento compartilhado e pela dedicação.

Aos colegas da pós-graduação e graduação pelo convívio dentro e fora do SETSUI; a jornada é mais leve quando temos com quem compartilhar. Às amigas, Aline, Ana P. e Gabriela por toda ajuda antes, durante e após os experimentos, pois, graças a vocês foi possível a realização desse estudo.

À ACSURS e à sua equipe da Central de Processamento de Sêmen, em especial, à Patrícia e ao Luciano Amaral pela parceria e disponibilidade para realização dos experimentos.

À Minitub do Brasil pela parceria, pelos insumos fornecidos e apoio técnico.

Aos membros da banca, Ender Oberst, Franciele Siqueira e Ivan Bianchi por aceitarem compor a banca de avaliação e, assim, contribuírem com a elaboração deste trabalho.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

À CAPES pela bolsa de estudos.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO E USO DE ANTIMICROBIANOS NA QUALIDADE DE DOSES SEMINAIS DE SUÍNOS

A bacteriospermia pode prejudicar a qualidade das doses de sêmen suíno. Desta forma, a adição de antimicrobianos (ATM) aos diluentes de sêmen é imprescindível para a manutenção da qualidade das doses inseminantes. Contudo, a crescente ocorrência de resistência bacteriana tem impulsionado a redução do uso de ATM na suinocultura. Nesse sentido, o armazenamento das doses inseminantes em baixas temperaturas pode ser uma alternativa para a remoção dos ATM dos diluentes comerciais. Sendo assim, no presente estudo, foram realizados dois experimentos para avaliar a qualidade espermática e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de doses de sêmen suíno submetidas a baixas temperaturas de armazenamento, na ausência ou presença de ATM. No experimento 1, as motilidades (total e progressiva) das doses com ATM foram maiores conforme aumentou a temperatura de armazenamento ($P < 0,01$). Nas doses sem ATM, as motilidades foram inferiores nas mantidas a 5 °C do que nas demais ($P < 0,05$). O número de UFC/mL foi menor nas doses sem ATM mantidas a 5 e 10 °C do que a 17 °C ($P < 0,05$), mas não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento nas doses com ATM ($P > 0,05$). As integridades de acrossoma e de membrana plasmática não foram afetadas ($P > 0,05$) pelo uso de ATM, mas foram influenciadas pela temperatura de armazenamento ($P < 0,0001$). No experimento 2, os machos foram categorizados em BONS e RUINS de acordo com a motilidade progressiva das doses com ATM armazenadas a 5 °C nas 120 h, sendo investigado o efeito dessas categorias sobre as variáveis estudadas. A motilidade total das doses armazenadas a 17 °C foi superior à das mantidas a 5 °C diluídas sem ATM ($P < 0,05$). Os percentuais de motilidade progressiva e de acrossomas normais foram superiores nas doses mantidas a 17 °C do que nas mantidas a 5 °C, com ou sem ATM ($P < 0,05$). O número de UFC/ml foi maior nas doses diluídas sem ATM do que nas demais ($P < 0,05$). Após a categorização dos machos, as motilidades (total e progressiva) foram maiores nos machos BONS do que nos RUINS ($P < 0,05$), sem diferença significativa ($P > 0,05$) nas integridades (acrossomal e de membrana plasmática). Apesar de a qualidade espermática ter sido afetada negativamente pelas baixas temperaturas, o armazenamento das doses de sêmen suíno a 5 °C é possível, uma vez que foi mantida a viabilidade espermática *in vitro*, por até 5 dias, acima do nível mínimo considerado adequado para a inseminação artificial. Contudo, o uso de doses sem antimicrobianos ainda precisa de otimização, posto que as baixas temperaturas de armazenamento reduzem, mas não inibem por completo o crescimento bacteriano.

Palavras-chave: reprodução de suínos, temperatura de armazenamento, sêmen diluído, bactéria, mesófilos totais

ABSTRACT

EVALUATION OF STORAGE TEMPERATURE AND USE OF ANTIBIOTICS IN BOAR SEMEN DOSE QUALITY

Bacteriospermia can impair boar semen dose quality. Thus, the addition of antibiotics (ATB) is indispensable for maintaining semen doses quality. Nevertheless, growing bacterial resistance occurrence have had driven to a reduction in use of ATB in pig industry. In this sense, storage of semen doses at low temperature may be an alternative to removal ATB of commercial semen extenders. Therefore, the aim of the present study was to assess sperm quality and number of colony-forming units (CFU mL⁻¹) in boar semen doses stored at low storage temperatures with or without ATB, in two experiments. In experiment 1, in semen doses with ATB, total and progressive motility increased as the storage temperature increased (P<0.01). In semen doses without ATB, total and progressive motility were observed to be lower when stored at 5 °C than at 10 and 17 °C (P<0.05). The number of CFU mL⁻¹ was lower in semen doses without ATB stored at 5 and 10 °C than at 17 °C (P<0.05), but there was no difference among storage temperatures in doses with ATB (P>0.05). Acrosome and sperm membrane integrity were not influenced (P>0.05) by using ATB, but they were influenced by storage temperature (P<0,0001). In experiment 2, boars were grouped in GOOD and POOR according to progressive motility in doses stored for up to 120 h at 5 °C. So, the effect of this classification on assessed variables, was investigated. Total motility was higher in doses stored at 17 °C than in doses without ATB stored at 5 °C (P<0.05). The percentages of progressive motility and normal acrosomes were higher in doses stored at 17 °C than in doses stored at 5 °C, with or without ATB (P<0.05). The number of CFU mL⁻¹ was higher in doses without ATB than in remaining ones (P<0.05). Total and progressive motility were observed to be higher in GOOD than in POOR boars (P<0.05). There was no difference between groups of boars in acrosome and membrane integrity (P>0.05). Despite sperm quality was negatively affected by low temperatures, the storage of boar semen doses at 5 °C is possible, since sperm viability in vitro was maintained for up to 5 days, fulfilling the requirements of semen quality to be used in artificial insemination. Nevertheless, the use of semen doses without ATB will need optimization, since low storage temperatures decreased bacterial growth, but not completely inhibit it.

Keywords: *swine reproduction, storage temperature, extended semen, bacteria, total mesophiles*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de movimento espermático de acordo com a temperatura de armazenamento e a presença ou ausência de antimicrobianos	30
Tabela 2 - Parâmetros de movimento espermático de acordo com a temperatura ao longo do período de armazenamento	31
Tabela 3 - Parâmetros de movimento espermático após teste de termorresistência de 30, 120 e 300 min de incubação a 38 °C de acordo com a temperatura de armazenamento das doses por 120 h	34
Tabela 4 - Parâmetros de movimento espermático após teste de termorresistência de 30, 120 e 300 min de incubação a 38 °C de acordo com a presença ou ausência de antimicrobianos no sêmen armazenado por 120 h	35
Tabela 5 - Percentuais de motilidade (total e progressiva), integridade de membrana e acrossomal e pH em doses de sêmen suíno de acordo com a temperatura de armazenamento e presença ou ausência de antimicrobianos	39
Tabela 6 - Qualidade das doses com antimicrobiano ao longo do armazenamento a 5 °C, em diferentes categorias de machos classificados de acordo com a sensibilidade ao resfriamento	42
Tabela 7 - Características de movimento espermático das doses com antimicrobiano ao longo do armazenamento a 5 °C, em diferentes categorias de machos classificados de acordo com a sensibilidade ao resfriamento	43
Tabela 8 - Motilidade espermática de doses com antimicrobianos armazenadas a 5 °C por 120 h e submetidas a teste de termorresistência de 30, 120 e 300 min de incubação a 38 °C, em categorias de machos classificados de acordo com a sensibilidade ao resfriamento	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Danos resultantes de choque térmico pelo frio no espermatozoide suíno	13
Figura 2 - Fluxo de trabalho dos experimentos.....	23
Figura 3 - Curva demonstrando mudanças na temperatura média das amostras que foram armazenadas a 5 °C	28
Figura 4 - Motilidade total e motilidade progressiva considerando diluente com e sem antimicrobianos e temperaturas de armazenamento (5, 10 e 17 °C)	29
Figura 5 - Motilidade total e motilidade progressiva após teste de termorresistência (TTR) considerando diluente com e sem antimicrobianos e temperaturas de armazenamento (5, 10 e 17 °C)	32
Figura 6 - Valores de pH ao longo do armazenamento (24, 72 e 120 h) de doses inseminantes diluídas com ou sem antimicrobianos e mantidas em diferentes temperaturas (5, 10 e 17 °C)	36
Figura 7 - Frequência de amostras dentro de cada categoria de contagem de mesófilos (UFC/mL) nas 72 h de armazenamento, em doses de sêmen diluídas com ou sem antimicrobianos e mantidas em diferentes temperaturas (5, 10 e 17 °C)	37
Figura 8 - Frequência de amostras dentro de cada categoria de contagem de mesófilos (UFC/mL) nas 72 h de armazenamento, em doses de sêmen diluídas com ou sem antimicrobianos, de acordo com a temperatura de armazenamento (5 ou 17 °C)	40
Figura 9 - Motilidade progressiva (%) nas 120 h de armazenamento de doses diluídas com antimicrobianos e conservadas a 5 °C, em cada coleta (1, 2 e 3), das três categorias de machos – BONS (A, B, C e D), INTERMEDIÁRIOS (E, F, G e H) e RUINS (I, J, K e L)	41

LISTA DE ABREVIACOES

ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ATM - antimicrobianos

BCF – frequência com que o trajeto real cruza o trajeto médio

BSA – albumina sérica bovina

BTS – Beltsville Thawing Solution

CASA – Sistema de Análise de Sêmen Computadorizada

EDTA – cido etileno-diamino-tetracético

IA – inseminaco artificial

LIN – linearidade: relação entre VSL/VCL

PI – sonda fluorescente iodeto de propdeo

STR – retilinearidade: relação entre VSL/VAP

TTR – teste de termorresistência

VAP – velocidade percorrida do trajeto médio

VCL – velocidade percorrida do trajeto real

VSL – velocidade percorrida do trajeto em linha reta

WOB – wobble; oscilação: relação entre VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Alterações na célula espermática durante o choque térmico pelo frio	13
2.2	Controle da temperatura durante análise e processamento das doses	14
2.3	Temperatura de armazenamento das doses.....	17
2.4	Bacteriospermia	19
3	OBJETIVOS.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO.....	46
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) tem sido utilizada na suinocultura desde a década de 30 (BORTOLOZZO et al., 2015) e, na década de 90, passou por uma revolução que resultou no amplo uso da técnica em diversos países (KNOX, 2016). Uma das causas dessa revolução foram os avanços obtidos na produção de doses de sêmen, os quais permitiram armazenar as doses inseminantes em temperaturas entre 15-20 °C mantendo a qualidade e a viabilidade espermáticas por períodos superiores a 3 dias (BORTOLOZZO et al., 2005). Contudo, sob essas temperaturas de armazenamento relativamente altas, o crescimento de bactérias mesófilas é favorecido (SCHULZE et al., 2015b). Os efeitos desse crescimento podem diferir de acordo com as bactérias presentes na dose. Já foi relatado que quase não houve efeito negativo na longevidade das doses inseminantes quando os contaminantes foram *Staphylococcus* spp. e *Alcaligenes* spp., apesar dos altos níveis (10¹⁰ a 10¹² UFC/mL) causando redução no pH. Por outro lado, foi também relatada diminuição da sobrevivência espermática durante o armazenamento a 15 °C quando espécies como *E. coli* e *Pseudomonas* estiveram presentes (KUSTER; ALTHOUSE, 2016). Além dos danos à célula espermática durante o armazenamento, o desempenho reprodutivo pós-IA também pode sofrer impacto da bacteriospermia por efeitos diretos na fêmea (WABERSKI, 2017). Sendo assim, a adição de antimicrobianos aos diluentes se torna necessária para reduzir o crescimento bacteriano e, assim, propiciar a manutenção da qualidade das doses de sêmen, além de evitar a transmissão de patógenos via IA (KNOX, 2016).

Os antimicrobianos mais usados em diluentes de sêmen suíno são da classe dos aminoglicosídeos, sendo as classes de β -lactâmicos e lincosamidas também escolhas comuns (ALTHOUSE; LU, 2005). Tais antimicrobianos atuam bloqueando ou interferindo em reações bioquímicas essenciais ao ciclo de vida das bactérias susceptíveis (ALTHOUSE; LU, 2005). Porém, devido à coexistência de bactérias, antimicrobianos e desinfetantes com matérias susceptíveis à formação de biofilmes, nos laboratórios das centrais de IA, existe um risco do desenvolvimento de resistência bacteriana e sua dispersão via IA (WABERSKI, 2017). Desta forma, existem esforços para um uso mais consciente dos antimicrobianos na suinocultura. Dentre os esforços, podem ser citadas medidas como a adição de uma dose final padrão de antimicrobianos a doses inseminantes produzidas com diluentes sem antimicrobianos em sua formulação, a remoção física de bactérias a partir de centrifugação em coloide de camada única e o uso de peptídeos

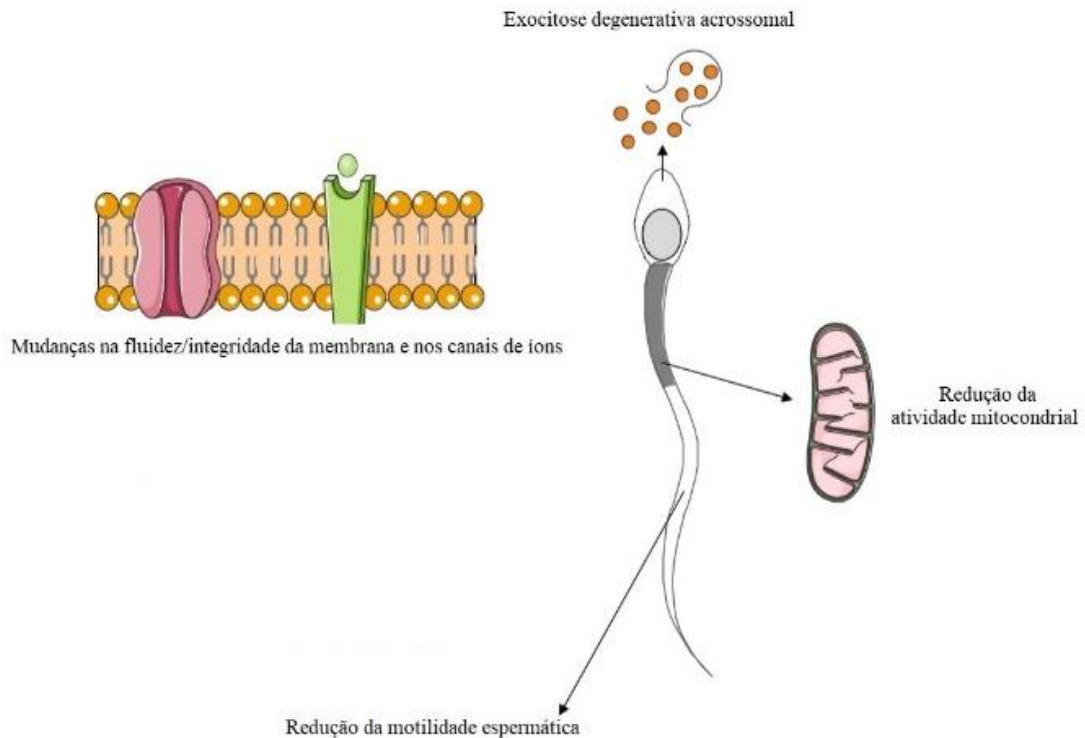
antimicrobianos catiônicos (MORRELL; WALLGREN, 2014; SCHULZE et al., 2015b; SCHULZE et al., 2016). Neste contexto, o armazenamento hipotérmico sem o uso de antimicrobianos seria uma alternativa, desde que a viabilidade espermática seja mantida e que a contaminação bacteriana das doses de sêmen suíno seja controlada. O armazenamento em baixas temperaturas foi testado anteriormente, mas sem resultados satisfatórios para a utilização na prática da IA, uma vez que, após 48 h de armazenamento, as doses já apresentaram motilidade inferior a 70% (ALTHOUSE et al., 1998; KATZER et al., 2005; WEITZE et al., 2000). Entretanto, existe pouca informação a respeito do armazenamento em baixa temperatura com diluentes comerciais modernos, cuja fórmula tenha sido melhorada no intuito de proteger a membrana espermática contra o choque pelo frio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alterações na célula espermática durante o choque térmico pelo frio

O espermatozoide suíno é sensível ao resfriamento, característica que dificulta a manutenção da viabilidade espermática quando há queda na temperatura do sêmen *in natura* e diluído (WEITZE et al., 2000). Desta forma, o resfriamento é um evento estressante para o espermatozoide e, quando o sêmen é rapidamente resfriado, uma parte da população espermática não sobrevive. Provavelmente, os danos causados pelo choque térmico pelo frio não são devidos a uma mudança na configuração das proteínas da membrana plasmática, nem a uma variação nos carboidratos da superfície do glicocálix, mas podem estar relacionados à composição e organização da bicamada lipídica e às mudanças na fluidez da membrana plasmática (WATSON, 1996). À medida que a temperatura diminui, os fosfolipídios têm sua mobilidade lateral reduzida. Desta forma, pode ocorrer a separação lateral de fases, e as proteínas ficam agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado fluido (DE LEEUW et al., 1990). Toda essa modificação torna as membranas mais permeáveis e, existindo íons cálcio no ambiente, eles adentram na célula (BAILEY et al., 2008), induzindo os processos que levam à um processo semelhante à capacitação espermática (Figura 1). Ainda, pode ocorrer um desequilíbrio iônico, com influxo de sódio e zinco e efluxo de potássio e magnésio, levando à interrupção no mecanismo de geração de energia para manutenção do ambiente interno das células (HOOD et al., 1970), que pode causar redução da motilidade espermática (Figura 1).

Figura 1. Danos resultantes de choque térmico pelo frio no espermatozoide suíno.



Fonte: Adaptado de Yeste (2016).

2.2 Controle da temperatura durante análise e processamento das doses

Como a célula espermática suína é sensível ao choque térmico pelo frio, cuidados com a temperatura, desde a coleta do ejaculado até seu armazenamento, são de extrema importância. Tais cuidados envolvem o aquecimento prévio de todos os materiais que entram em contato com o sêmen, como o uso de copo térmico pré-aquecido a 36 °C para a coleta do ejaculado, uso de placas aquecedoras para aquecimento de ponteiras, tubos, lâminas e lamínulas, e uso de microscópio com mesa aquecida para avaliação de motilidade espermática, dentre outros. Sendo assim, a diluição do sêmen é um dos primeiros desafios a que o ejaculado é submetido, tanto pela alteração, ainda que momentânea, de osmolaridade, quanto de pH, mas, principalmente, de temperatura (BORTOLOZZO et al., 2005; RIESENBECK et al., 2015). Na prática, são estabelecidos dois tipos de diluição, em uma ou em duas etapas. Quando utilizada a diluição em uma etapa, preconiza-se que a temperatura do diluente seja próxima à temperatura do ejaculado (diluição isotérmica), e que ela seja feita dentro de 30 min após a coleta, até o completar o volume final (SCHULZE et al., 2013). Quando o sêmen é diluído em duas etapas, na primeira recomenda-se fazer uma diluição isotérmica (sêmen:diluente) de 1:1

ou 1:2 (BORTOLOZZO et al., 2005). Porém, quanto à segunda diluição, os estudos são controversos e divergem quanto à recomendação, existindo a possibilidade de que essa segunda diluição seja isotérmica ou hipotérmica. No estudo de Schulze et al. (2013), a diluição em duas etapas, sendo a primeira isotérmica e a segunda, hipotérmica, resultou em prejuízo na qualidade da dose inseminante, em termos de integridade de membrana (89,2% vs. 86,8%), atividade mitocondrial (84,7% vs. 82,4%) e motilidade espermática progressiva (80,4% vs. 75,0%), após teste de termorresistência de 30 min, em doses armazenadas por 168 h. Neste estudo, as velocidades de resfriamento foram de 0,3 °C (31,6 °C para 31,3 °C) e 5,6 °C (29,0 para 23,4 °C) em 3 min após adição do diluente para as diluições iso e hipotérmica, respectivamente. A velocidade de resfriamento mais alta para a diluição hipotérmica pode ter resultado em uma desorganização molecular nas membranas celulares dos espermatozoides suínos (SCHULZE et al., 2013). Contudo, segundo outros autores (ALMEIDA et al., 2015; LÓPEZ RODRIGUEZ et al., 2012), a temperatura do diluente ao redor de 23 °C, na segunda diluição (segunda diluição hipotérmica), não influenciou a qualidade das doses inseminantes em termos de motilidade espermática total e progressiva, integridade de membrana e células morfológicamente normais.

O próximo desafio das células espermáticas é o resfriamento até a temperatura de armazenamento. Uma das medidas preconizadas para melhorar a sobrevivência espermática é a manutenção das doses inseminantes em temperatura ambiente (22-24 °C) por aproximadamente 90 min (BORTOLOZZO et al., 2008), para adaptação ao meio diluente e para que ocorra uma queda mais lenta da temperatura, a fim de reduzir os danos ocasionados pelo choque térmico pelo frio (KATZER et al., 2005). Ao utilizar diluição isotérmica, a permanência das doses na temperatura ambiente de 21 °C por 90 min resultou em velocidade de resfriamento de 0,13 °C/min nos primeiros 30 min, de 0,08 °C/min nos 30 min seguintes e de 0,05 °C/min nos últimos 30 min, passando da temperatura de 31,3 para 23,3 °C (SCHULZE et al., 2013). No mesmo estudo, mas com diluição hipotérmica, a taxa de resfriamento foi de 0,03 °C/min nos primeiros 30 min, 0,01 °C/min nos 30 min seguintes e 0,01 °C/min nos últimos 30 min, passando da temperatura de 23,4 para 21,9 °C. Após este período de estabilização, as doses inseminantes podem, então, ser armazenadas em conservadoras de sêmen em temperaturas de 15-18 °C. Segundo Schulze et al. (2013), o sêmen suíno diluído em duas etapas, sendo a primeira isotérmica, a 32 °C, alcança temperatura aproximada de 19 °C após 180 min da primeira diluição e atinge a temperatura final de armazenamento, a 17

°C, após 276 e 291 min para diluição iso e hipotérmica, respectivamente. Quando foram comparadas doses armazenadas diretamente a 17 °C, após diluição, com doses que passaram por período de adaptação de 90 min, em temperatura ambiente, antes de serem armazenadas a 17 °C, estas últimas apresentaram melhores índices de motilidade total e progressiva nas 24 h de armazenamento e integridade de membrana plasmática (81% vs 75%) e acrossomal (94,8% vs 92,6%) (MENEZES et al., 2016). Esse período para adaptação, também chamado de tempo de espera (*holding time*), pode ser de poucas horas ou chegar a durar um dia todo, sendo ainda mais importante quando o sêmen é armazenado à temperatura de 5 °C ou é criopreservado (CASAS; ALTHOUSE, 2013). Quando doses de sêmen suíno foram armazenadas a 5 °C por 24 h, após resfriamento a uma velocidade de 0,06 °C/min (durante 3 h), doses que tinham sido previamente mantidas a 17 °C, por 24 h, apresentaram motilidade superior às doses que não passaram por esse período para adaptação (80,4% vs 68,0%, respectivamente) (CASAS; ALTHOUSE, 2013). O período de adaptação de 24 h a 17 °C foi benéfico para o armazenamento por 120 h de doses inseminantes a 12 °C, visto que os percentuais de membranas íntegras e de acrossomas normais foram semelhantes aos adquiridos nas doses mantidas a 17 °C (62,4% vs 62,2% e 83,2% vs 86,6% de membranas íntegras e acrossomas normais a 12 °C (24 h/17 °C + 96 h/12 °C) e a 17 °C, respectivamente) (KATZER et al., 2004). No estudo de Katzer et al. (2004), após o período a 17 °C, a queda de temperatura na primeira hora foi de 0,06 °C/min e da segunda a quarta hora, de 0,01 °C/min. Além disso, doses armazenadas a 5 °C ou congeladas e descongeladas, quando passaram pelo tempo de espera a 15 °C por 3,5 h, durante o resfriamento, tiveram maior proporção de acrossomas normais do que as doses que não passaram por este período, apesar de não terem suas motilidade e viabilidade afetadas pelo mesmo (MAXWELL; JOHNSON, 1997). Após este “holding time”, em protocolos de congelamento, são recomendadas velocidades de resfriamento de 0,1 °C/min, 0,4 °C/min ou taxa ainda superior, de 1,5 °C/min (que pode diminuir o tempo necessário para o protocolo), para resfriar o sêmen suíno até a temperatura de 4 °C (YESTE, 2015). Para a descida da temperatura até -6 °C a velocidade de resfriamento pode ser de 11 °C/min e, posteriormente, até -80 °C, de 32 a 41 °C/min, segundo Bortolozzo et al. (2005), quando o sêmen suíno é congelado em palhetas de 0,5 mL. Por fim, as amostras podem ser imersas em nitrogênio líquido à -196 °C.

2.3 Temperatura de armazenamento das doses

Todas as etapas que levam à preservação do sêmen suíno sob refrigeração exercem efeitos sobre as células espermáticas, causando estresse e resultando em danos ou morte celular (WABERSKI et al., 2011). Um dos principais fatores que vai atuar sobre a função espermática durante o armazenamento *in vitro* é a temperatura a que o sêmen será submetido após a diluição, já que o espermatozoide suíno é muito sensível ao choque térmico pelo frio (JOHNSON et al., 2000). Desta forma, busca-se armazenar as doses de sêmen suíno em temperaturas que possibilitem baixar seu metabolismo e reduzir o crescimento bacteriano, mas que, ao mesmo tempo, mantenham a qualidade e a viabilidade espermáticas.

Ao comparar quatro temperaturas de armazenamento de doses de sêmen suíno (4, 15, 20 e 39 °C) por 48 h, as temperaturas de 20 e 15 °C foram melhores em manter a motilidade do que as temperaturas de 39 e 4 °C (ZOU; YANG, 2000). Isto porque, segundo os autores, provavelmente, na temperatura mais alta, o metabolismo espermático continuou alto, levando a um rápido consumo energético e, na mais baixa, houve o choque térmico pelo frio. Quando as doses inseminantes foram armazenadas a 8, 10, 12, 14 ou 17 °C com uma velocidade de resfriamento de 2 a 4 °C/h, dentro de 12 h após o armazenamento a 8 °C a motilidade já foi inferior a 70% e, após 48 h, as doses armazenadas a 10 °C tiveram motilidade menor que 70% e as armazenadas a 12, 14 e 17 °C mantiveram motilidade superior a 75% (ALTHOUSE et al., 1998). Neste mesmo estudo, ao fazer testes *in vivo*, a taxa de parto (93 vs 95%) e o tamanho da leitegada (11,58 vs 11,61) foram semelhantes entre os grupos de fêmeas inseminadas com doses de sêmen diluído em Androhep® e mantidas a 12 e a 17 °C por até 60h, respectivamente. Contudo, Pursel et al. (1973) concluíram que manter o sêmen suíno em temperatura entre 24 e 26 °C por, pelo menos, 1,25 h para adaptação antes do resfriamento a 5 °C pode melhorar a manutenção da integridade do acrossoma e da motilidade espermática, durante o armazenamento. Os efeitos benéficos do período de adaptação prévia ao armazenamento também foram evidenciados quando foram avaliadas diferentes temperaturas (25, 20 e 15 °C) e períodos (0, 4, 8 e 24 h) de adaptação prévia ao armazenamento a 5 °C, em que a adaptação aumentou a resistência ao resfriamento e que o período foi mais importante que a temperatura de adaptação (WEITZE et al., 2000). Sendo assim, ao manter as doses inseminantes a 25 °C para adaptação, apesar de haver redução nos percentuais de motilidade e acrossomas normais em relação às armazenadas a 15 °C, quanto maior foi o

período de adaptação menor foi a redução nesses parâmetros. Em outro estudo, comparando o sêmen diluído em BTS mantido em duas temperaturas distintas, tanto a motilidade quanto a integridade de membrana nas 72, 96 e 120 h de armazenamento foram superiores no sêmen diluído mantido a 17 °C que no mantido a 5 °C, independentemente de ter passado por período prévio de adaptação (24 h a 17 °C ou 8 h a 22 °C mais 16 h a 17 °C) ou não (KATZER et al., 2005). Os autores relataram que para as doses com período de adaptação, as primeiras 2 h de resfriamento tiveram velocidades de 0,06 °C/min e de aproximadamente 0,02 °C/min. Além dos períodos de adaptação, Katzer et al. (2005) testaram uma curva de resfriamento com queda lenta da temperatura entre 22 e 5 °C, com velocidades de 0,07 °C/min, 0,04 °C/min, 0,03 °C/min, 0,02 °C/min e 0,01 °C/min, entre os períodos de 0-1h, 1-2h, 2-3h, 3-7h e 7-11h, respectivamente. Porém, os percentuais de motilidade espermática, membranas íntegras e acrossomas normais do sêmen suíno resfriado em BTS ainda foram inferiores aos das amostras armazenadas a 17 °C. Até o momento, os resultados de motilidade e integridade acrossomal ainda não foram suficientemente satisfatórios (valores menores que 70% já nas 72 h de armazenamento) para viabilização do armazenamento do sêmen suíno em temperaturas mais baixas, por exemplo a 5 °C, que as praticadas atualmente. Desta forma, o armazenamento em temperaturas inferiores à 15 °C precisa de aprimoramento de forma que haja a manutenção da qualidade das células espermáticas.

Somado ao progresso com o período de adaptação prévia ao armazenamento das doses inseminantes, novos diluentes capazes de prolongar a vida fértil do sêmen e manter a viabilidade das células espermáticas em baixas temperaturas, são continuamente testados. Os diluentes são soluções aquosas utilizadas para aumentar o volume do ejaculado a fim de produzir maior número de doses, ao mesmo tempo em que mantém as características funcionais dos espermatozoides e adequada taxa de fertilidade após inseminação (GADEA, 2003). Os primeiros diluentes foram adaptados dos usados em bovinos e continham apenas fonte energética para as células espermáticas (glicose) e tampões de pH e osmolaridade (bicarbonato/citrato de sódio e cloreto de potássio; JOHNSON et al., 2000). Estes componentes estão presentes e suas fontes são bastante semelhantes entre os diversos diluentes existentes mundialmente. O que os diferencia são, principalmente, os sistemas para remoção de metabólitos, antioxidantes, e os compostos adicionados para estabilizar as membranas celulares (FLOWERS, 2004). Exemplos destes estabilizadores de membrana são o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) – que age como quelante de íons, prevenindo o início da capacitação e reação acrossomal

(BORTOLOZZO et al., 2005) – e a albumina sérica bovina (BSA) – que pode agir como compensador para o “efeito da diluição”, conferir proteção contra o choque térmico pelo frio e estimular a motilidade espermática (BORTOLOZZO et al., 2005; GADEA, 2003). Além disso, cada empresa desenvolve seus próprios protetores de membrana, os quais são usados em conjunto com antioxidantes, em suas formulações. Por exemplo, o diluente Androhep® (Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha) possui a BSA em sua composição e foi um dos primeiros aceitos como de longa duração, viabilizando o armazenamento do sêmen suíno por mais de 72 h. Por outro lado, atualmente, os fabricantes de um novo diluente, Androstar® Premium (Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha), optaram por formular um diluente de longa duração que não mais contém a BSA como estabilizador de membrana, mas sim moléculas inovadoras chamadas de ingrediente protetor de membrana.

2.4 Bacteriospermia

O sêmen suíno, proveniente de animais hígidos, é normalmente livre de contaminação, mas esta pode ser decorrente de duas vias principais, de origem animal ou não animal. A origem animal pode ser fecal, prepucial ou, ainda, ligada à pele e aos pelos do suíno propriamente dito ou estar ligada à higiene do coletador e da coleta. A origem não animal é mais relacionada à qualidade, tanto do sistema de ventilação do laboratório, quanto do sistema de purificação da água para a produção dos diluentes (ALTHOUSE et al., 2000; KUSTER; ALTHOUSE, 2016). Avaliando 24 centrais de inseminação artificial na Alemanha e na Áustria, por um período de quatro anos, foi constatado que, em apenas 4,5% das doses contaminadas, as mesmas bactérias foram encontradas nas amostras de sêmen *in natura*, o que sugere que a contaminação ocorre no ambiente laboratorial (SCHULZE et al., 2015a). Uma das bactérias mais comumente encontradas nas doses de sêmen suíno é a *Escherichia coli* que já foi correlacionada com aglutinação espermática ($r = 0,86$) e causou significativa redução no tamanho da leitegada, quando a contagem foi superior a $3,5 \times 10^3$ CFU/mL (MARTÍN et al., 2010). Além desta, já foram relatadas *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* (ALTHOUSE et al., 2000; ALTHOUSE; LU, 2005; UBEDA et al., 2013), entre outras.

O sêmen suíno geralmente é contaminado por bactérias Gram-negativas, principalmente as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (ALTHOUSE et al., 2008; ALTHOUSE; LU, 2005). A contaminação bacteriana prejudicou a qualidade das doses seminais, ocasionando aglutinação das células espermáticas e redução da longevidade das doses (vida útil inferior a 48 h), com impacto no desempenho reprodutivo pós-IA (ALTHOUSE et al., 2000). Esses autores relataram queda da motilidade espermática, com 96% das amostras analisadas apresentando motilidade inferior a 5% ou todos os espermatozoides imóveis, dentro de 48 h após o processamento, e elevado retorno ao cio nas fêmeas inseminadas com doses contaminadas e armazenadas por períodos superiores a 48 h.

Desta forma, é comum a utilização de antimicrobianos adicionados aos diluentes com a finalidade de reduzir o crescimento bacteriano, ao longo do armazenamento das doses seminais. Entretanto, o uso contínuo dos antimicrobianos tem acarretado em aumento da resistência antimicrobiana. Segundo Althouse e Lu (2005), de 78 amostras analisadas entre os anos de 2002 e 2003, 86% dos isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos presentes no diluente utilizado para o processamento do sêmen. Já em outro estudo, com 37 doses provenientes de centrais da América do Norte, todas as bactérias isoladas se mostraram resistentes à gentamicina, um dos antimicrobianos mais comumente usados nos diluentes comerciais (ALTHOUSE et al., 2000). Sendo assim, novas alternativas estão sendo desenvolvidas e testadas com intuito de reduzir ou substituir a utilização destes antimicrobianos comuns, como a incorporação de florfenicol em substituição de parte da gentamicina (BRYLA; TRZCINSKA, 2015) e os peptídeos antimicrobianos (SCHULZE et al., 2015b). Outra possibilidade é o armazenamento em temperaturas mais baixas do que as praticadas rotineiramente, o que permite reduzir ainda mais a atividade metabólica da célula, mantendo a viabilidade espermática e controlando efetivamente as condições microbiológicas, de forma a proteger os espermatozoides dos efeitos nocivos da contaminação bacteriana (GADEA, 2003).

3 OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar a influência da temperatura de armazenamento das doses de sêmen suíno e o uso de antimicrobianos sobre a qualidade e a viabilidade das células espermáticas, assim como sobre a contaminação bacteriana das doses inseminantes. Além disso, foi verificado se machos com menor sensibilidade ao resfriamento a 5 °C repetiriam os resultados ao longo de três coletas de sêmen. Por fim, averiguou-se se ao categorizar os machos, de acordo com a manutenção da motilidade sob baixa temperatura de armazenamento, haveriam diferenças entre as categorias de machos em outras variáveis capazes de predizer que determinado macho conseguiria manter ou não a viabilidade espermática de doses diluídas com antimicrobianos ao longo do armazenamento de 5 dias a 5 °C.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto 32493).

Animais e instalações

Experimento 1

O sêmen de 34 reprodutores suínos (17 AGPIC 337® - Agrocere PIC, Patos de Minas, MG, Brasil e 17 Traxx® - Topigs Norsvin, Curitiba, PR, Brasil) foi usado para o experimento. Os animais tinham $13,3 \pm 3,8$ meses de idade (média \pm DP) e eram alojados em gaiolas individuais. Todos os machos eram rotineiramente coletados para produção de doses de sêmen, alimentados com dieta comercial à base de milho e farelo de soja (média de 2,5 kg/dia: 3,02 Mcal/kg energia metabolizável aparente, 19,68% proteína bruta e 1,07% lisina total), com acesso *ad libitum* à água.

Experimento 2

Com os dados obtidos dos 34 ejaculados utilizados no experimento 1, os machos foram categorizados de acordo com a motilidade progressiva nas 120 h de armazenamento a 17 e 5 °C, em dois grupos: machos BONS ou RUINS em manter a motilidade sob essas condições (BONS: MP17 °C > 80% e MP5 °C > 70%; RUINS: MP17 °C > 80% e MP5 °C < 70%). Destes 34 reprodutores, 15 foram selecionados para serem acompanhados por mais três coletas cada – com intervalos quinzenais entre as mesmas, totalizando 45 ejaculados (7 AGPIC 337® - Agrocere PIC, Patos de Minas, MG, Brasil e 8 Traxx® - Topigs Norsvin, Curitiba, PR, Brasil).

Coleta de sêmen e processamento

Cada ejaculado foi obtido por sistema semiautomático de coleta (Sistema de Coleta BoarMatic, Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha) e, posteriormente, pesado e analisado quanto à motilidade espermática e concentração usando sistema computadorizado de análise de sêmen (SpermVision®, MOFA Global, Verona, Estados Unidos da América). Apenas ejaculados que apresentaram motilidade espermática superior a 70% e menos de 20% de células espermáticas morfologicamente anormais foram usados.

Após as análises iniciais, o diluente aquecido a 36 °C - Androstar® Premium (Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha) - com ou sem antimicrobianos (ampicilina e apramicina), foi adicionado ao sêmen em *split-sample*. Foram produzidas doses inseminantes de 1,5 bilhões de células móveis com volume total de 45 mL. Depois de envasadas, as doses inseminantes foram transportadas, por 4 h em média, até o Laboratório do Setor de Suínos (Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS) acondicionadas em caixas de transporte, com temperatura controlada entre 22 e 24 °C.

Delineamento experimental

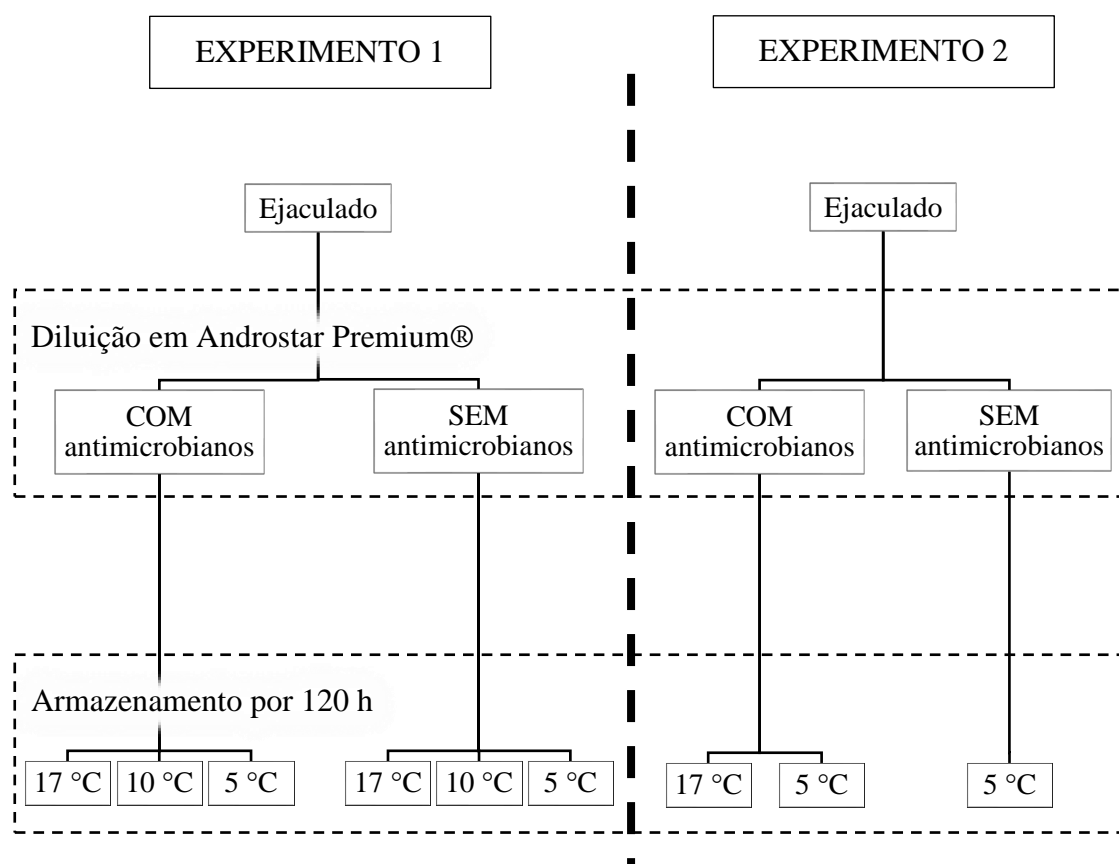
Experimento 1

Foi utilizado um delineamento fatorial 3 × 2 (temperatura de armazenamento × uso ou não de antimicrobianos). As doses foram armazenadas em três diferentes temperaturas: imediatamente após o transporte, um terço das doses foi colocado em conservadora mantida a 17 °C, e um terço, a 10 °C. O terço restante foi mantido em temperatura ambiente (22-24 °C) até completar 6 h da diluição e, então, foi armazenado em conservadora a 5 °C. Logo, foram formados seis tratamentos: 17COM (doses armazenadas a 17 °C e diluídas com antimicrobianos); 17SEM (doses armazenadas a 17 °C e diluídas sem antimicrobianos); 10COM (doses armazenadas a 10 °C e diluídas com antimicrobianos); 10SEM (doses armazenadas a 10 °C e diluídas sem antimicrobianos); 5COM (doses armazenadas a 5 °C e diluídas com antimicrobianos), e 5SEM (doses armazenadas a 5 °C e diluídas sem antimicrobianos).

Experimento 2

As doses foram armazenadas em duas temperaturas: imediatamente após o transporte, um terço das doses foi colocado em conservadora mantida a 17 °C. Os dois terços restantes foram mantidos em temperatura ambiente (22-24 °C) até completar 6 h da diluição e, então, foram armazenados em conservadora a 5 °C. Logo, foram formados três tratamentos: 17COM (doses armazenadas a 17 °C e diluídas com antimicrobianos); 5COM (doses armazenadas a 5 °C e diluídas com antimicrobianos), e 5SEM (doses armazenadas a 5 °C e diluídas sem antimicrobianos).

Figura 2. Fluxo de atividades dos experimentos



Cada ejaculado foi dividido para ser diluído em diluente com e sem antimicrobianos nos dois experimentos. No experimento 1, tanto as doses preparadas com antimicrobianos quanto as doses preparadas sem antimicrobianos eram armazenadas à 17, 10 e 5 °C. No experimento 2, as doses preparadas com antimicrobianos foram armazenadas a 17 e 5 °C, enquanto as doses preparadas sem antimicrobianos foram armazenadas apenas a 5 °C.

Experimentos 1 e 2

Parâmetros espermáticos de movimento

Foram realizadas análises de motilidade espermática, usando sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA: AndroVison®, Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha), após 24, 72 e 120 h de armazenamento. Amostras de 1,0 mL das doses inseminantes foram incubadas a 37 °C em blocos de metal por 20 min. Posteriormente, alíquotas de 3,0 µL foram usadas para preencher câmaras de contagem espermática (Leja®, 20 µm de diâmetro, Nieuw Vennep, Holanda) e serem analisadas sob microscopia de contraste de fase (Axio Scope.A1, Zeiss®, Alemanha) com aumento de 200×.

Morfologia e integridade de acrossoma

Amostras de sêmen *in natura* e das doses de sêmen foram fixadas em solução de formol-citrato (2,94%) para análises de morfologia espermática e integridade de acrossoma, respectivamente. Todas as amostras foram avaliadas usando microscopia de contraste de fase com aumento de 1000×.

Para análises de morfologia foram contabilizados 200 espermatozoides que foram classificados em normais ou com defeitos, tais como de acrossoma, cabeça, peça intermediária, gota citoplasmática proximal ou distal e cauda dobrada ou enrolada (CBRA, 2013). A análise de integridade de acrossoma das doses inseminantes foi feita após 24, 72 e 120 h de armazenamento. Para isso, foram contabilizadas 200 células espermáticas classificadas em acrossoma íntegro ou não íntegro, nesse último caso quando apresentavam acrossoma destacado, em destacamento ou irregular (PURSEL et al., 1972).

Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática das células espermáticas foi verificada após diluição e transporte, e após 24, 72 e 120 h de armazenamento, usando microscopia de fluorescência (AxioScope.A1 HAL 100-FL, Filter Set 09, BP 450-490, Zeiss®, Alemanha). Para isso, amostras de 50 µL das doses de sêmen foram incubadas a 37 °C em blocos de metal, por pelo menos 15 min, com 2,5 µL de solução corante com sonda fluorescente SYBR14 e iodeto de propídio (LIVE/DEAD® Sperm Viability kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para o experimento 1 foi feita análise visual e 200 células espermáticas foram contabilizadas manualmente. Já no experimento 2, a análise foi realizada automaticamente com o sistema CASA AndroVision® e foram contabilizados, pelo menos, 1000 espermatozoides.

Teste de termorresistência

Após 120 h de armazenamento, amostras de 15 mL das doses inseminantes foram incubadas em banho-maria (BraunBiotech®, Allentown, PA, EUA) a 38 °C por até 300 min, usando um protocolo adaptado de Schulze et al. (2013). Aos 30, 120 e 300 min de incubação, foram realizadas análises de motilidade espermática das amostras usando o sistema CASA, como descrito anteriormente.

Análise de pH

O pH das doses inseminantes foi mensurado na chegada ao laboratório e após 24, 72 e 120 h de armazenamento, usando pH-metro digital (Experimento 1: Quimis® Q400AS, São Paulo, SP, Brasil; Experimento 2: Akso® pH Pro, São Leopoldo, RS, Brasil).

Contagem de mesófilos

Foram feitas análises microbiológicas do sêmen *in natura* e das doses inseminantes, na chegada ao laboratório e após 72 h de armazenamento, usando a técnica *pour plate* em ágar padrão para contagem (PCA: Acumedia®, Neogen Corporation, Lansing, Michigan, EUA). Foram efetuadas diluições sucessivas das amostras de sêmen *in natura* (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-4}) e as amostras de sêmen diluídas com ou sem antimicrobianos, foram diluídas até 10^{-2} em solução salina 0,85%. Após 72 h de armazenamento, as amostras das doses 17SEM foram diluídas até 10^{-2} enquanto as demais amostras (17COM, 10COM, 10SEM, 5COM e 5SEM) foram diluídas até 10^{-1} , no experimento 1. No experimento 2, nas 72 h, todas as amostras foram diluídas até 10^{-2} . Alíquotas de 1,0 mL de cada diluição foram plaqueadas em duplicatas. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h quando se procedeu com a inspeção das placas e o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi obtido (GOLDBERG et al., 2013).

Análise estatística

Todas as análises foram feitas utilizando o software *Statistical Analysis System* – SAS (SAS versão 9.4, 2013). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

As variáveis motilidade, características de cinética espermática, integridade de acrossoma e de membrana plasmática, e pH foram analisadas como medidas repetidas usando o procedimento GLIMMIX. No experimento 1, foram considerados como efeitos fixos a presença de antimicrobiano, a temperatura, o momento de análise e suas interações, e o reprodutor foi incluído como efeito aleatório. Nas análises após teste de termorresistência de doses armazenadas por 120 h, a medida repetida foi o tempo de incubação das amostras a 38 °C. Para o experimento 2, foram considerados como efeitos fixos o momento de análise, tratamento e suas interações, antes de ser feita a categorização dos machos. Após a categorização, entraram no modelo, como efeito fixos, categoria, momento e sua interação.

O número de UFC/mL foi analisado em cada momento separadamente, pois, após diluição, as doses ainda não tinham sido armazenadas nas diferentes temperaturas. Sendo assim, após a diluição, foi analisado como tendo distribuição binomial negativa (procedimento GLIMMIX), comparando a presença e ausência de antimicrobiano. No experimento 1, nas 72 h de armazenamento, o número de UFC/mL foi incontável em algumas doses e a análise foi, então, realizada com regressão logística multinomial ordinal usando o procedimento GLIMMIX, tendo como resposta cinco categorias de UFC/mL (0; 1-100; 101-1000; 1001-18600 e UFC incontável). Nesse momento, a presença de antimicrobiano, a temperatura de armazenamento e sua interação foram incluídos no modelo como efeitos fixos, e o reprodutor como efeito aleatório. No experimento 2, nas 72 h de armazenamento, somente houve crescimento em três categorias (0; 1-100 e 101-1000 UFC/mL) e, neste experimento, não mais existiram amostras com número de UFC/mL incontável. Nesta análise, o tratamento entrou como efeito fixo.

5 RESULTADOS

Experimento 1

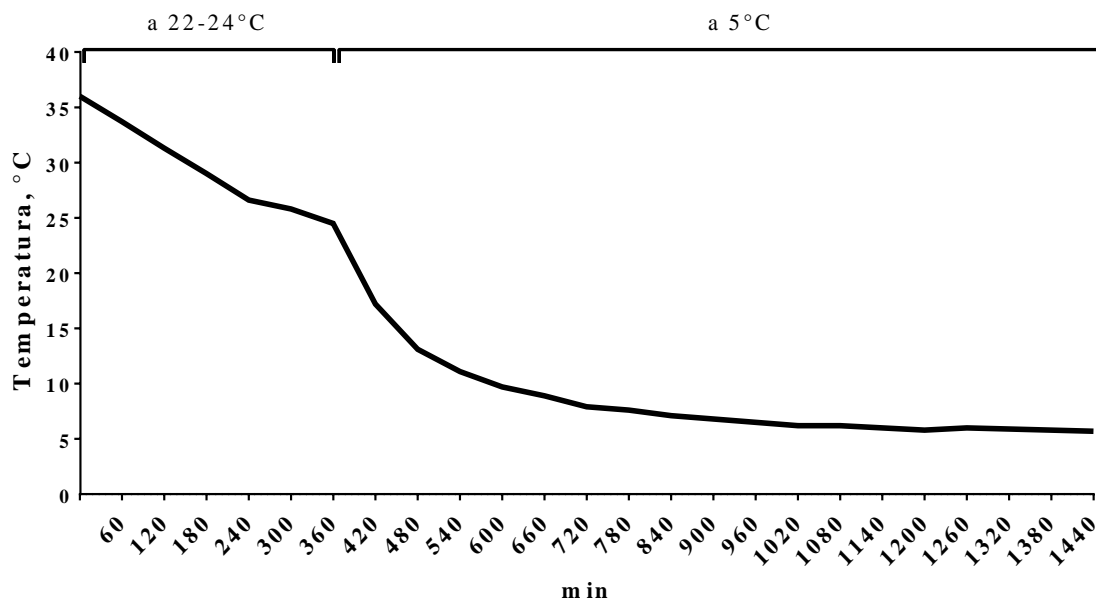
Características das doses in natura e na chegada ao laboratório

As porcentagens de motilidade total, motilidade progressiva e células morfológicamente normais (médias \pm desvios-padrão) observadas no sêmen *in natura* foram $92,0 \pm 2,0$, $80,1 \pm 8,9$ e $93,5 \pm 4,2$, respectivamente. O percentual de células com membrana plasmática íntegra (LSmeans \pm erro padrão da média) após chegada ao laboratório, período de aproximadamente 4 h, foram $86,46 \pm 0,9$ e $85,89 \pm 0,9$ para doses de sêmen diluído com e sem antimicrobianos, respectivamente ($P=0,3319$). Neste mesmo momento, o pH foi de 7,23 e 7,36 para doses de sêmen diluído com e sem antimicrobianos, respectivamente ($P<0,0001$). A contagem de mesófilos (média \pm desvio-padrão) no sêmen *in natura* foi de $14461,6 \pm 30801,1$ UFC/mL e, após chegada ao laboratório (LSmeans \pm erro padrão da média), foi de $10,5 \pm 4,0$ e $689,3 \pm 260,2$ para doses produzidas com e sem antimicrobianos, respectivamente ($P<0,0001$).

Curva de resfriamento

As doses foram mantidas por 6 h em temperatura controlada (22-24 °C), após serem diluídas e envasadas, até que fossem acondicionadas em conservadora a 5 °C (Figura 3). Durante essas 6 h, a temperatura baixou de 36 °C para 24,5 °C, em velocidade de resfriamento de 1,9 °C/h. Em seguida, as doses foram armazenadas a 5 °C e, na primeira hora, houve queda da temperatura até 17,2 °C. As doses inseminantes apenas atingiram a temperatura final de armazenamento após 12 h dentro da conservadora a 5 °C, o que representou uma velocidade de resfriamento de 1,6 °C/h.

Figura 3. Curva demonstrando mudanças na temperatura média das amostras que foram armazenadas a 5 °C.

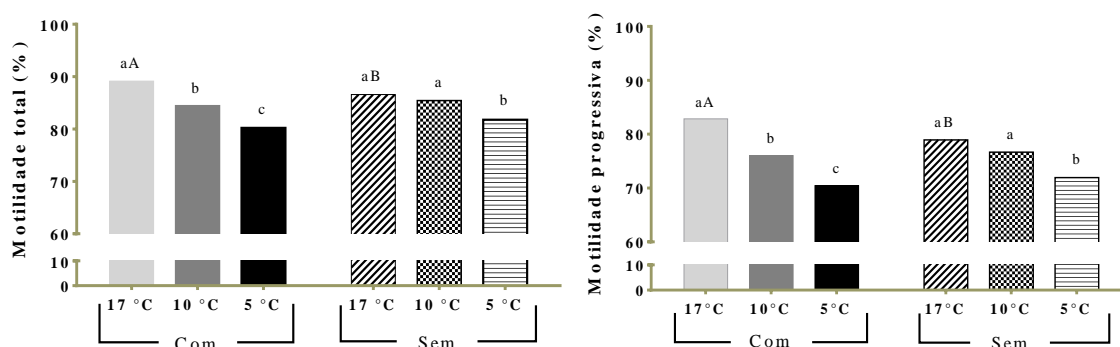


Nas primeiras 6 h pós-diluição, as doses foram mantidas em caixa de transporte, com temperatura controlada entre 22 e 24 °C e, então, acondicionadas em conservadora a 5 °C.

Parâmetros de movimento espermático

A motilidade total e a motilidade progressiva foram afetadas pela interação entre antimicrobiano e temperatura (Figura 4; $P= 0,0042$ e $P= 0,0046$, respectivamente). Nas doses com antimicrobianos, as motilidades foram menores conforme diminuiu a temperatura de armazenamento ($P<0,05$). Já nas doses sem antimicrobianos, as motilidades foram similares nas doses armazenadas a 17 e 10 °C, sendo superiores às mantidas a 5 °C ($P<0,05$). As doses produzidas sem antimicrobianos apresentaram menores motilidades em comparação às produzidas com antimicrobianos, apenas quando foram armazenadas a 17 °C ($P<0,05$).

Figura 4. Motilidade total e motilidade progressiva considerando diluente com e sem antimicrobianos e temperaturas de armazenamento (5, 10 e 17 °C).



a, b e c: indicam diferença significativa entre as temperaturas de armazenamento ($P < 0,05$), dentro das amostras diluídas com ou sem antimicrobianos.

A, B: indicam diferença significativa entre o uso de antimicrobianos ($P < 0,05$), dentro das temperaturas de armazenamento.

Quanto aos parâmetros cinéticos, houve efeito da interação entre antimicrobiano e temperatura de armazenamento para VCL, VSL, VAP e ALH (Tabela 1) que, nas doses diluídas com antimicrobianos, foram superiores a 17 °C do que a 5 °C, mas não para BCF, STR, LIN e WOB (dados não apresentados). A interação entre antimicrobiano e tempo de armazenamento ocorreu para os parâmetros STR e LIN. Nas 24 e nas 120 h, LIN foi maior nas amostras com do que nas sem antimicrobianos. Tanto STR quanto LIN caíram a partir das 72 h nas doses com antimicrobianos, mas diferiram entre todos os tempos de armazenamento, nas doses sem antimicrobianos. Além disso, houve a interação entre temperatura e tempo de armazenamento para motilidades total e progressiva, VSL, BCF, ALH, STR, LIN e WOB (Tabela 2). A motilidade (total e progressiva) foi maior a 17 °C do que a 10 e 5 °C, nas 24 e 72 h, enquanto que, nas 120 h, foi maior a 17 e 10 °C do que a 5 °C. VSL, BCF, STR, LIN e WOB foram superiores, nas 72 e 120 h, nas doses mantidas a 17 °C do que a 5 °C, enquanto ALH foi maior a 17 °C do que a 5 °C, nas 24 e 72 h.

Tabela 1. Parâmetros de movimento espermático de acordo com a temperatura de armazenamento e a presença ou ausência de antimicrobianos

Variáveis	COM antimicrobianos			SEM antimicrobianos		
	17 °C	10 °C	5 °C	17 °C	10 °C	5 °C
VCL, $\mu\text{m/s}$	113,6 \pm 3,2aX	110,9 \pm 3,2ab	104,2 \pm 3,2b	101,6 \pm 3,2Y	107,8 \pm 3,2	101,6 \pm ,2
VSL, $\mu\text{m/s}$	41,4 \pm 1,3aX	34,1 \pm 1,3b	32,9 \pm 1,3b	36,4 \pm 1,3aY	32,5 \pm 1,3b	31,5 \pm 1,3b
VAP, $\mu\text{m/s}$	53,6 \pm 1,7aX	49,7 \pm 1,7b	47,4 \pm 1,7b	47,5 \pm 1,7Y	47,2 \pm 1,7	45,3 \pm 1,7
ALH, μm	1,15 \pm 0,03aX	1,13 \pm 0,03a	1,04 \pm 0,03b	1,06 \pm 0,03abY	1,11 \pm 0,03a	1,03 \pm 0,03b

Valores expressos como LSmeans \pm erro padrão da média.

a, b: indicam diferença significativa entre temperaturas ($P < 0,05$), dentro do uso ou não de antimicrobianos.

X e Y: indicam diferença significativa dentro da temperatura de armazenamento ($P < 0,05$).

VCL=velocidade percorrida do trajeto real; VSL=velocidade percorrida do trajeto em linha reta; VAP=velocidade percorrida do trajeto médio; ALH=amplitude de deslocamento lateral da cabeça.

Tabela 2. Parâmetros de movimento espermático de acordo com a temperatura ao longo do período de armazenamento

Variáveis	24 h			72 h			120 h		
	17 °C	10 °C	5 °C	17 °C	10 °C	5 °C	17 °C	10 °C	5 °C
MOTTOT, %	89,1±0,9aX	86,2±1,2b	84,7±1,3bX	89,0±1,0aX	84,9±1,2b	80,6±1,5cY	85,3±1,4aY	83,6±1,6a	77,2±2,0bY
MOTPROG, %	82,6±1,3aX	78,4±1,6b	76,8±1,7bX	82,8±1,3aX	76,3±1,7b	70,0±2,0cY	77,2±1,9aY	74,3±2,1a	66,1±2,5bY
VSL, µm/s	39,8±1,3aX	35,1±1,3bX	35,7±1,3bX	40,3±1,3aX	33,3±1,3bY	31,6±1,3bY	36,6±1,5aY	31,4±1,5bY	29,3±1,5bY
BCF, Hz	19,6±0,6X	19,5±0,6X	19,3±0,6X	19,2±0,6aX	18,2±0,6abY	17,1±0,6bY	17,7±0,7aY	17,2±0,7abY	15,8±0,7bZ
ALH, µm	1,11±0,02aXY	1,05±0,02bX	1,00±0,02cX	1,14±0,03aX	1,15±0,03aY	1,06±0,03bY	1,07±0,03aY	1,17±0,03bY	1,05±0,03aXY
STR	0,78±0,01aX	0,73±0,01bX	0,75±0,01cX	0,77±0,01aY	0,68±0,01bY	0,67±0,01bY	0,76±0,01aY	0,65±0,01bZ	0,65±0,01bZ
LIN	0,36±0,01a	0,33±0,01bX	0,35±0,01cX	0,36±0,01a	0,30±0,01bY	0,30±0,01bY	0,36±0,01a	0,28±0,01bZ	0,29±0,01bZ
WOB	0,47±0,01a	0,45±0,01bX	0,46±0,01aX	0,47±0,01a	0,44±0,01bY	0,44±0,01bY	0,47±0,01a	0,43±0,01bY	0,44±0,01bY

Valores expressos como $L_{smeans} \pm$ erro padrão da média.

a, b e c: indicam diferença significativa entre as temperaturas ($P < 0,05$), dentro do momento de armazenamento.

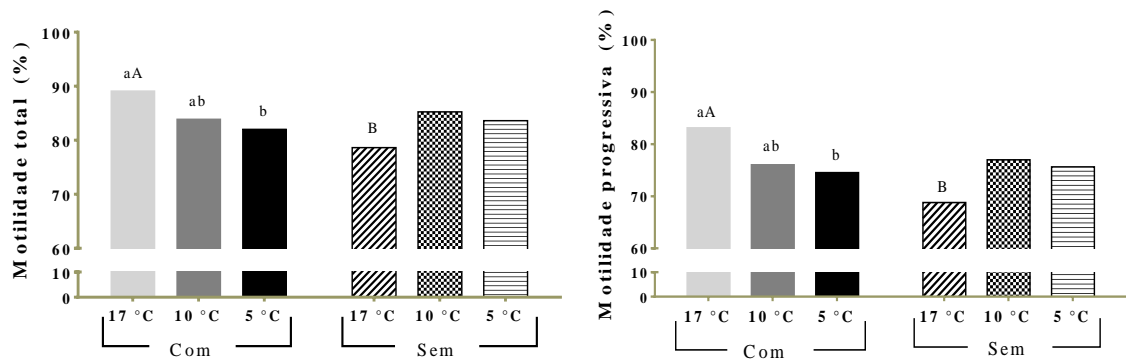
X, Y e Z: indicam diferença significativa entre os momentos ($P < 0,05$), dentro da temperatura de armazenamento.

MOTTOT= Motilidade total; MOTPROG= motilidade progressiva; VCL=velocidade percorrida do trajeto real; VSL=velocidade percorrida do trajeto em linha reta; BCF=frequência com que o trajeto real cruza com o trajeto médio; ALH=amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR=retilinearidade (VSL/VAP; VAP=velocidade percorrida do trajeto médio); LIN=linearidade (VSL/VCL); WOB=oscilação (VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio).

Teste de termorresistência

A motilidade total e a motilidade progressiva das doses armazenadas por 120 h, após o teste de termorresistência, foram afetadas pela interação entre antimicrobiano e temperatura (Figura 5; $P=0,0005$). Para ambas as motilidades (total e progressiva), as doses produzidas com antimicrobianos apresentaram maiores motilidades, quando armazenadas a 17 °C em comparação às armazenadas a 5 °C ($P<0,05$). No entanto, nas doses sem antimicrobianos não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento ($P>0,05$). Além disso, houve diferença das motilidades (total e progressiva) entre as doses produzidas com e sem antimicrobianos, apenas nas armazenadas a 17 °C ($P<0,001$).

Figura 5. Motilidade total e motilidade progressiva após teste de termorresistência considerando diluente com e sem antimicrobianos e temperaturas de armazenamento (5, 10 e 17 °C).



a, b: indicam diferença significativa entre as temperaturas de armazenamento ($P<0,05$), dentro das amostras diluídas com ou sem antimicrobianos.

A, B: indicam diferença significativa entre o uso de antimicrobianos ($P<0,05$), dentro das temperaturas de armazenamento.

A motilidade total e a motilidade progressiva também foram afetadas pela interação entre temperatura de armazenamento e tempo de incubação a 38 °C (Tabela 3; $P=0,0290$ e $P=0,0346$ para motilidade total e progressiva, respectivamente). Ambas as motilidades caíram ao longo da incubação nas doses armazenadas a 17 °C, e nas armazenadas a 10 °C foram maiores aos 30 do que aos 300 min. Essa mesma interação ocorreu para os parâmetros cinéticos, exceto para a VSL. VCL e ALH diminuíram ao longo da incubação nas doses armazenadas a 17 °C, enquanto nas armazenadas a 10 °C foram maiores aos 30 do que aos 300 min. Nas doses mantidas a 17 °C, VAP foi maior nos 30 do que nos 120 e nos 300 min de incubação, mas nas mantidas a 5 e 10 °C houve diferença entre 30 min e 300 min. Nas doses mantidas a 17 °C, BCF foi maior aos 120 do

que aos 300 min de incubação. Ainda, as motilidades (total e progressiva) foram afetadas pela interação entre antimicrobiano e tempo de incubação a 38 °C (Tabela 4; $P=0,0067$ e $P=0,0054$ para motilidade total e progressiva, respectivamente), sendo observada redução das motilidades nas doses com antimicrobianos aos 300 min, enquanto houve redução, dos 30 para os 120 min, nas doses sem antimicrobianos. Essa mesma interação ocorreu também para os parâmetros BCF, LIN e WOB (Tabela 4), sendo maiores nas doses com antimicrobianos do que nas doses sem, aos 30 min de incubação, e BCF também aos 120 min.

pH das doses de sêmen

Houve efeito ($P=0,0018$) da interação tripla (uso de antimicrobianos \times temperatura \times tempo de armazenamento) no pH das doses de sêmen (Figura 6). Nas 24 h de armazenamento, o pH nas doses de sêmen diluído com antimicrobianos foi mais baixo do que nas doses de sêmen sem antimicrobianos. Nas 72 h de armazenamento, as doses 10SEM e 17SEM tiveram maior pH que as demais, enquanto as doses 5COM tiveram o menor pH. Nas 120 h de armazenamento, o pH das doses 17SEM diminuiu, diferentemente do pH das demais doses que aumentou.

Tabela 3. Parâmetros de movimento espermático após teste de termorresistência de 30, 120 e 300 min de incubação a 38 °C de acordo com a temperatura de armazenamento das doses por 120 h

Variáveis	30 min			120 min			300 min		
	17 °C	10 °C	5 °C	17 °C	10 °C	5 °C	17 °C	10 °C	5 °C
MOTTOT, %	87,6±1,0X	87,4±1,0X	84,5±1,2X	85,3±1,3Y	85,1±1,3Y	82,9±1,5XY	80,3±1,7Z	80,8±1,6Z	81,0±1,6Y
MOTPROG, %	80,4±1,5X	79,4±1,6X	76,2±1,8	77,2±1,8Y	76,9±1,8X	75,5±1,9	72,1±2,0Z	72,9±2,0Y	73,6±2,0
VCL, µm/s	85,8±3,0X	91,7±3,0X	90,1±3,0X	96,8±3,4Y	88,6±3,4X	91,5±3,4X	114,2±3,8Z	105,4±3,8Y	112,0±3,8Y
VAP, µm/s	50,3±1,7X	47,9±1,7X	48,3±1,7X	57,4±1,9aY	50,4±1,9bX	52,9±1,9abY	60,9±1,9Y	56,6±1,9Y	59,8±1,9Z
BCF, Hz	18,5±0,5XY	19,4±0,5	18,2±0,5	18,6±0,5X	18,7±0,5	17,9±0,5	17,3±0,5Y	18,2±0,5	18,0±0,5
ALH, µm	0,80±0,02X	0,86±0,02X	0,85±0,02X	0,86±0,03Y	0,81±0,03X	0,84±0,03X	1,03±0,03Z	0,95±0,03Y	1,02±0,03Y
STR	0,86±0,01a	0,77±0,01bX	0,79±0,01bX	0,86±0,01a	0,83±0,01bY	0,85±0,01aY	0,85±0,01a	0,83±0,01bY	0,84±0,01bY
LIN	0,51±0,01aX	0,41±0,01bX	0,43±0,01bX	0,52±0,01aX	0,48±0,01bY	0,50±0,01abY	0,47±0,01Y	0,45±0,01Z	0,45±0,01X
WOB	0,59±0,01aX	0,52±0,01bX	0,54±0,01bX	0,60±0,01aX	0,57±0,01bY	0,58±0,01abY	0,55±0,01Y	0,54±0,01X	0,54±0,01X

Valores expressos como Lsmeans ± erro padrão da média.

a, b: indicam diferença significativa entre as temperaturas ($P<0,05$), dentro do tempo de incubação.

X, Y e Z: indicam diferença significativa entre os momentos ($P<0,05$), dentro da temperatura de armazenamento.

MOTTOT= Motilidade total; MOTPROG= motilidade progressiva; VCL=velocidade percorrida do trajeto real; VSL=velocidade percorrida do trajeto em linha reta; BCF=frequência com que o trajeto real cruza com o trajeto médio; ALH=amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR=retilinearidade (VSL/VAP; VAP=velocidade percorrida do trajeto médio); LIN=linearidade (VSL/VCL); WOB=oscilação (VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio).

Tabela 4. Parâmetros de movimento espermático após teste de termorresistência de 30, 120 e 300 min de incubação a 38 °C de acordo com a presença ou ausência de antimicrobianos no sêmen armazenado por 120 h

Variáveis	30 min		120 min		300 min	
	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM
Motilidade Total, %	87,3±0,9X	85,7±1,0X	86,4±1,0X	82,4±1,3Y	81,8±1,3Y	79,5±1,4Z
Motilidade Progressiva, %	80,5±1,2X	76,8±1,4X	79,4±1,4aX	73,4±1,6bY	74,2±1,6Y	71,5±1,7Y
BCF, Hz	19,4±0,4aX	18,0±0,4b	19,4±0,5aX	17,5±0,5b	18,3±0,5Y	17,5±0,5
LIN	0,46±0,01aX	0,43±0,01bX	0,51±0,01Y	0,49±0,01Y	0,46±0,01X	0,46±0,01Z
WOB	0,56±0,01aX	0,54±0,01bX	0,59±0,01Y	0,58±0,01Y	0,54±0,01Z	0,55±0,01X

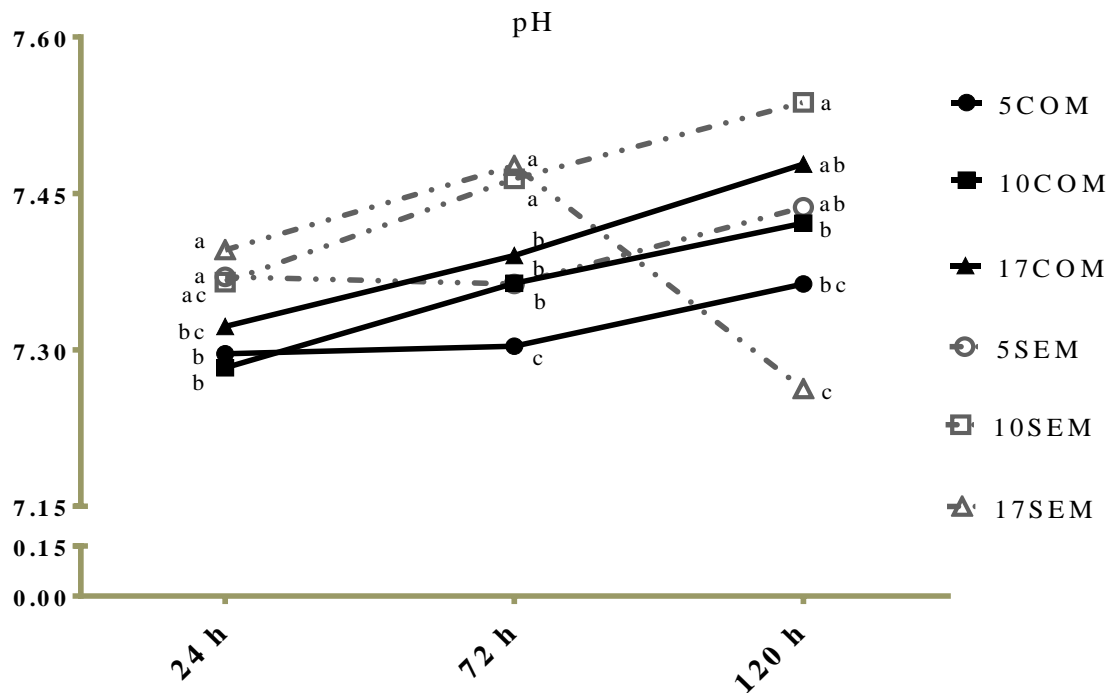
Valores expressos como Lsmeans ± erro padrão da média.

a, b: indicam diferença significativa dentro do tempo de incubação ($P<0,05$).

X, Y e Z: indicam diferença significativa entre os momentos ($P<0,05$), dentro da temperatura de armazenamento.

VCL=velocidade percorrida do trajeto real; VSL=velocidade percorrida do trajeto em linha reta; BCF=frequência com que o trajeto real cruza com o trajeto médio; ALH=amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR=retilinearidade (VSL/VAP; VAP=velocidade percorrida do trajeto médio); LIN=linearidade (VSL/VCL); WOB= oscilação (VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio).

Figura 6. Valores de pH ao longo do armazenamento (24, 72 e 120 h) de doses inseminantes diluídas com ou sem antimicrobianos e mantidas em diferentes temperaturas (5, 10 e 17 °C).



a, b e c indicam diferença significativa dentro do tempo de armazenamento ($P < 0,05$).

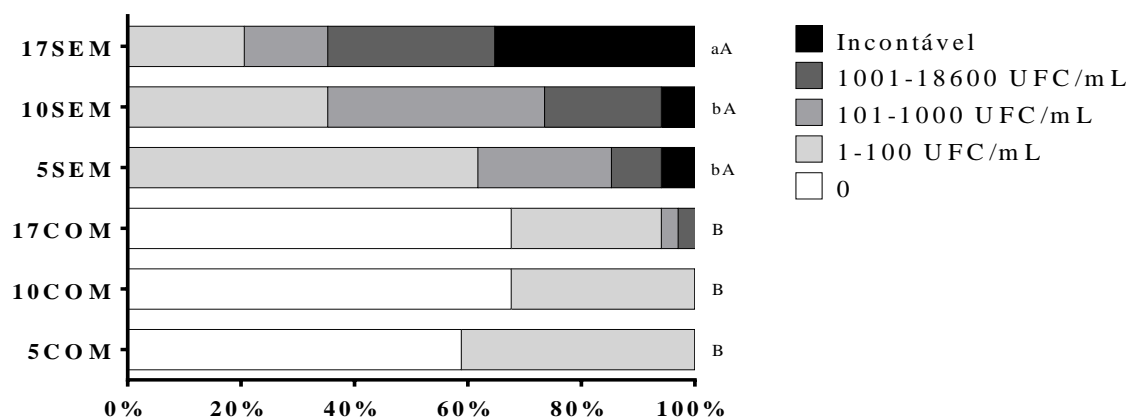
5COM, 10COM e 17COM: doses diluídas com antimicrobianos armazenadas a 5, 10 e 17 °C, respectivamente.

5SEM, 10SEM e 17SEM: doses diluídas sem antimicrobianos armazenadas a 5, 10 e 17 °C, respectivamente.

Contagem de mesófilos

A contagem de mesófilos nas 72 h de armazenamento das doses diluídas com antimicrobianos foi semelhante entre as três temperaturas de armazenamento (Figura 7; $P > 0,05$). Entretanto, das doses diluídas sem antimicrobianos, as doses mantidas a 17 °C apresentaram maior contagem bacteriana que as doses armazenadas a 5 e 10 °C (Figura 7; $P < 0,05$). Independentemente da temperatura de armazenamento, as doses de sêmen diluído sem antimicrobianos apresentaram maior contagem bacteriana do que as doses de sêmen diluído com antimicrobianos (Figura 7; $P < 0,05$).

Figura 7. Frequência de amostras dentro de cada categoria de contagem de mesófilos (UFC/mL) nas 72 h de armazenamento, em doses de sêmen diluídas com ou sem antimicrobianos e mantidas em diferentes temperaturas (5, 10 e 17 °C).



a, b: indicam diferença significativa dentro das amostras diluídas sem antimicrobianos ($P < 0,05$).
 A, B: indicam diferença significativa dentro da temperatura de armazenamento ($P < 0,05$).
 5COM, 10COM e 17COM: doses diluídas com antimicrobianos armazenadas a 5, 10 e 17 °C, respectivamente.
 5SEM, 10SEM e 17SEM: doses diluídas sem antimicrobianos armazenadas a 5, 10 e 17 °C, respectivamente.

Associação entre a contaminação e a motilidade espermática

Para verificar o efeito da maior contagem de bactérias das doses 17SEM sobre a motilidade espermática, foram feitas duas categorias de contaminação às 72 h de armazenamento: baixa (até 1.000 UFC/mL) e alta contaminação (acima de 1.000 UFC/mL). Foi observada maior motilidade total às 120 horas de armazenamento (87,4 vs 75,7%) e motilidade progressiva (80,3 vs 67,4%) nas doses de baixa contaminação ($P < 0,0001$). Além disso, às 120 h de armazenamento, houve correlação positiva entre o pH e motilidade total ($r = 0,89$, $P < 0,05$) e motilidade progressiva ($r = 0,87$, $P < 0,05$). O pH às 120 h foi de 7,57 e 7,10 para doses de baixa e alta contaminação, respectivamente ($P < 0,03$).

Experimento II

Características das doses in natura e na chegada ao laboratório

As porcentagens de motilidade total, motilidade progressiva e células morfológicamente normais (médias \pm desvios-padrão) observadas no sêmen *in natura* foram $92,2 \pm 3,0\%$, $82,6 \pm 1,2\%$ e $92,7 \pm 4,6\%$, respectivamente. Após a chegada ao laboratório (aproximadamente 3 h pós-diluição), os percentuais de células com membrana

plasmática íntegra (LSmeans \pm erro-padrão da média) foram $86,7 \pm 0,7\%$ e $86,9 \pm 0,7\%$ para doses de sêmen diluído com e sem antimicrobianos, respectivamente ($P>0,05$). Neste mesmo momento, o pH foi de $7,20 \pm 0,09$ e $7,36 \pm 0,09$ para doses de sêmen diluído com e sem antimicrobianos, respectivamente ($P<0,05$). A contagem de mesófilos (média \pm desvio-padrão) no sêmen *in natura* foi de $3474,3 \pm 4546,7$ UFC/mL e, após chegada ao laboratório (LSmeans \pm erro-padrão da média), os valores foram $1,7 \pm 0,5$ e $203,8 \pm 48,4$ UFC/mL para doses de sêmen diluído com e sem antimicrobianos, respectivamente ($P<0,05$).

Motilidade espermática, integridade de membrana e de acrossoma, pH e contagem de mesófilos

A motilidade total, a motilidade progressiva e o percentual de células espermáticas com membrana acrossomal íntegra não foram influenciados pela interação entre tratamento e momento, mas tiveram influência tanto do tratamento como do momento de armazenamento (Tabela 5; $P<0,05$). A motilidade total apenas diferiu entre 17COM e 5SEM. As doses 17COM tiveram maiores percentuais de motilidade progressiva e de acrossomas normais do que as doses 5COM e 5SEM ($P<0,05$). Houve queda da motilidade total e progressiva ao longo do armazenamento ($P<0,05$), enquanto o percentual de acrossomas normais diminuiu nas 72 e 120 h em comparação com 24 h ($P<0,05$). Quanto ao percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, ocorreu apenas a influência do momento de armazenamento com diferença nas 120 h (Tabela 5; $P<0,0001$).

O pH foi afetado pela interação entre tratamento e momento (Tabela 5; $P=0,0002$). O pH aumentou ($P<0,05$) ao longo do armazenamento no 17COM e 5COM, mas permaneceu estável no 5SEM. Em todos os momentos de armazenamento avaliados, o pH das doses 5SEM foi superior ao das doses 17COM e 5COM ($P<0,05$). A contagem de mesófilos foi influenciada pelo tratamento ($P<0,0001$), sendo mais baixa nas doses 17COM e 5COM em comparação às doses 5SEM (Figura 8; $P<0,05$): $2,21 \pm 0,59$; $2,25 \pm 0,60$, e $136,5 \pm 32,43$ para 17COM, 5COM e 5SEM, respectivamente.

Tabela 5. Percentuais de motilidade (total e progressiva), integridade de membrana e acrossomal e pH em doses de sêmen suíno de acordo com a temperatura de armazenamento e presença ou ausência de antimicrobianos

Variáveis	Tratamento	Tempo de armazenamento			Média
		24 h	72 h	120 h	
Motilidade total	17COM	89,4±0,9	89,2±0,9	85,8±1,1	88,2±0,8a
	5COM	88,1±1,0	85,8±1,1	81,9±1,4	85,4±0,9ab
	5SEM	88,0±1,0	85,7±1,1	80,7±1,4	85,0±1,0b
	Média	88,5±0,5A	87,0±0,6B	82,9±0,8C	
Motilidade Progressiva	17COM	84,7±1,1	84,1±1,1	79,6±1,4	82,9±1,0a
	5COM	83,2±1,2	79,4±1,4	74,1±1,6	79,1±1,2b
	5SEM	82,1±1,3	78,3±1,5	72,0±1,7	77,7±1,2b
	Média	83,4±0,7A	80,7±0,8B	75,4±0,9C	
Integridade de Membrana	17COM	85,1±0,8	86,1±1,0	87,7±1,1	86,3±0,8
	5COM	81,6±1,0	83,3±1,2	86,2±1,1	83,8±0,9
Integridade de Acrossomal	5SEM	83,5±0,9	84,4±1,1	85,1±1,2	84,4±0,9
	Média	83,5±0,5A	84,6±0,6 ^a	86,4±0,6B	
pH	17COM	97,2±0,3	96,9±0,3	95,9±0,4	96,7±0,3a
	5COM	95,5±0,4	94,7±0,5	94,4±0,5	94,9±0,4b
	5SEM	94,9±0,4	94,4±0,5	93,8±0,5	94,4±0,4b
	Média	96,0±0,2A	95,4±0,2B	94,8±0,3B	
pH	17COM	7,27±0,02xX	7,34±0,01xY	7,36±0,02xY	7,33±0,01
	5COM	7,29±0,02xX	7,32±0,01xY	7,35±0,02xY	7,32±0,01
	5SEM	7,48±0,02y	7,50±0,01y	7,52±0,02y	7,50±0,01
	Média	7,35±0,01	7,39±0,01	7,41±0,01	

Valores expressos como LSmeans ± erro padrão da média.

a, b na coluna: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

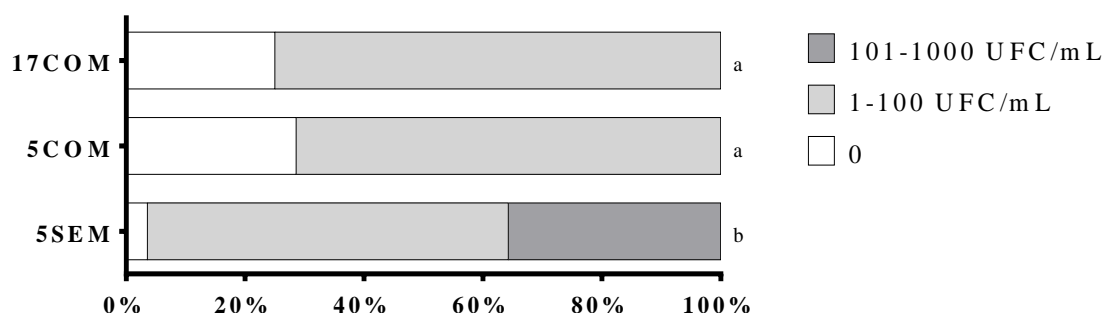
A, B e C na linha: indicam diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($P < 0,05$).

x, y na coluna: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), dentro de cada tempo de armazenamento.

X, Y na linha: indicam diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($P < 0,05$), dentro de cada tratamento.

17COM: armazenamento a 17 °C com uso de antimicrobianos; 5COM: armazenamento a 5 °C com uso de antimicrobianos; 5SEM: armazenamento a 5 °C sem uso de antimicrobianos.

Figura 8. Frequência de amostras dentro de cada categoria de contagem de mesófilos (UFC/mL) nas 72 h de armazenamento, em doses de sêmen diluídas com ou sem antimicrobianos, de acordo com a temperatura de armazenamento (5 ou 17 °C).



a, b: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

17COM: armazenamento a 17 °C com uso de antimicrobianos; 5COM: armazenamento a 5 °C com uso de antimicrobianos; 5SEM: armazenamento a 5 °C sem uso de antimicrobianos.

Comparação entre categorias de machos

Dos 15 machos selecionados a partir do primeiro experimento para serem acompanhados por outras três coletas, três foram removidos porque apresentaram motilidade progressiva inferior a 70%, nas 120 h de armazenamento a 17 °C. Após as exclusões, os 12 machos restantes foram classificados, de acordo com a motilidade progressiva nas 120 h de armazenamento, em doses com antimicrobianos conservadas a 5 °C (Figura 9), em três categorias: BONS – machos com motilidade progressiva superior a 75% nas três coletas; INTERMEDIÁRIOS – machos com motilidade progressiva inferior a 75% em pelo menos uma das coletas; RUINS – machos com motilidade progressiva inferior a 75% nas três coletas. Para investigar o efeito da categoria do macho, foram incluídos nas análises os machos considerados BONS e RUINS.

Os dados de motilidade e de integridade de membrana e de acrossoma ao longo do armazenamento a 5 °C das duas categorias estão apresentados na Tabela 6. Houve interação entre categoria e momento ($P < 0,001$) para as motilidades total e progressiva. As motilidades foram superiores para a categoria de machos BONS quando comparadas aos RUINS ($P < 0,05$), apenas no momento 120 h. Vale salientar que as doses de machos BONS não apresentaram queda de motilidades ao longo do armazenamento a 5 °C, enquanto que doses da categoria RUINS apresentaram redução da motilidade total com 120 h de armazenamento, e redução da motilidade progressiva às 72 h e às 120 h de armazenamento. As características de integridade de membrana e de acrossoma não

foram afetadas pela categoria dos machos, tempo de armazenamento a 5 °C e interação entre categoria e tempo de armazenamento ($P>0,05$).

Figura 9. Motilidade progressiva (%) nas 120 h de armazenamento de doses diluídas com antimicrobianos e conservadas a 5 °C, em cada coleta (1, 2 e 3), das três categorias de machos – BONS (A, B, C e D), INTERMEDIÁRIOS (E, F, G e H) e RUINS (I, J, K e L).

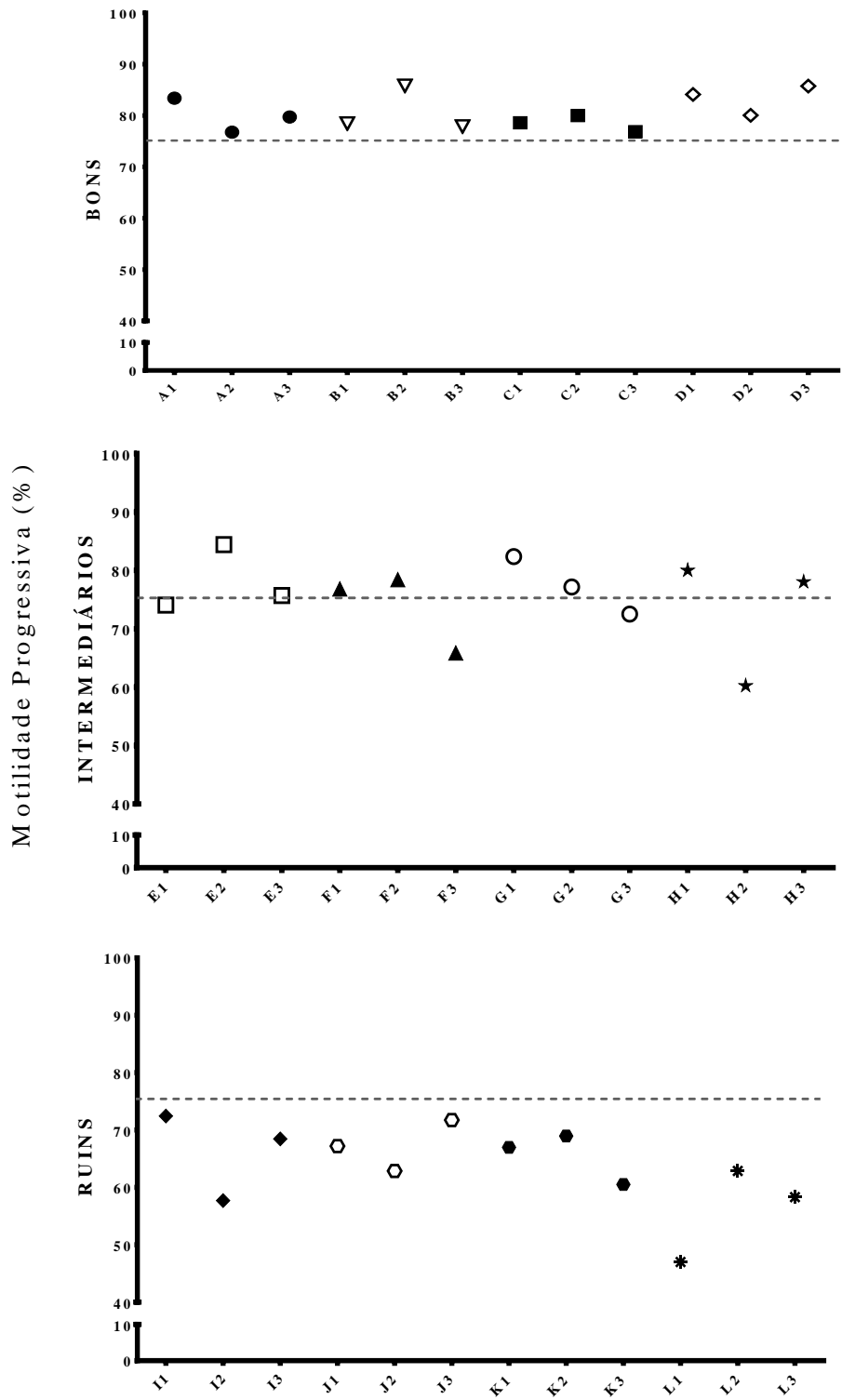


Tabela 6. Qualidade das doses com antimicrobiano ao longo do armazenamento a 5 °C, em diferentes categorias de machos classificados de acordo com a sensibilidade ao resfriamento

Variáveis	Categoria	Tempo de armazenamento			Média
		24 h	72 h	120 h	
Motilidade Total, %	BONS	89,8±1,7	86,0±1,3	86,8±1,0 x	87,7±1,1
	RUINS	88,9±1,8 X	84,0±1,5 X	74,8±1,6 Yy	83,4±1,4
	Média	89,4±1,2	85,0±1,0	81,6±0,9	
Motilidade Progressiva, %	BONS	85,3±2,0	80,0±1,5	80,8±1,2 x	82,2±1,2
	RUINS	83,6±2,2 X	76,4±1,7 Y	63,9±1,7 Zy	75,5±1,6
	Média	84,5±1,5	78,24±1,1	73,2±1,1	
Acrossomas normais, %	BONS	5,0±0,7	5,8±0,8	7,4±0,1	6,0±0,7
	RUINS	4,5±0,7	4,7±0,7	5,1±0,7	4,7±0,6
	Média	4,8±0,5	5,2±0,5	6,1±0,6	
Integridade de membrana, %	BONS	82,9±1,2	83,5±1,9	88,8±1,7	85,3±1,3
	RUINS	81,8±1,3	83,9±1,8	82,4±2,5	82,7±1,5
	Média	82,3±0,9	83,7±1,3	85,9±1,5	

Valores expressos como LSmeans ± erro padrão da média.

a, b na coluna: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$).

A, B e C na linha: indicam diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($P<0,05$).

x, y na coluna: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$), dentro de cada tempo de armazenamento.

X, Y na linha: indicam diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($P<0,05$), dentro de cada tratamento.

BONS: machos cujas doses com antimicrobianos apresentaram, nas 120 h de armazenamento, motilidade progressiva superior a 75% em todas as coletas.

RUINS: machos cujas doses com antimicrobianos apresentaram, nas 120 h de armazenamento, motilidade progressiva inferior a 75% em todas as coletas.

Houve efeito da interação entre categoria de machos e tempo de armazenamento ($P<0,05$) para as variáveis VCL, BCF e ALH (Tabela 7). O VCL da categoria de machos BONS foi superior ($P=0,0035$) à de RUINS somente nas 120 h. Machos classificados como BONS apresentaram valor de BCF superior nos momentos 72 h e 120 h. Além disso, os machos RUINS apresentaram redução de BCF ao longo do armazenamento, enquanto que os machos BONS mantiveram os valores estáveis. Para a categoria BONS, o ALH aumentou às 120 h. Já na categoria RUINS, o ALH aumentou às 72 h, sem diferença entre 24 h e 120 h. Não houve diferença para o ALH entre as categorias em cada tempo de armazenamento. Houve efeito da categoria dos machos para VSL e VAP (Tabela 7), sendo que os machos BONS apresentaram velocidades superiores aos RUINS ($P<0,01$). Houve efeito do tempo de armazenamento para VSL, STR, LIN e WOB (Tabela 7), sendo observada redução dos parâmetros ao longo do tempo ($P<0,0001$).

Tabela 7. Características de movimento espermático das doses com antimicrobiano ao longo do armazenamento a 5 °C, em diferentes categorias de machos classificados de acordo com a sensibilidade ao resfriamento

Variáveis	Categoria	Tempo de armazenamento			Média
		24 h	72 h	120 h	
VCL, $\mu\text{m/s}$	BONS	117,6 \pm 4,2	124,6 \pm 4,2	130,3 \pm 4,2 x	124,2 \pm 3,4
	RUINS	112,8 \pm 4,2	116,7 \pm 4,2	106,6 \pm 4,2 y	112,0 \pm 3,4
	Média	115,2 \pm 3,0	120,7 \pm 3,0	118,5 \pm 3,0	
VSL, $\mu\text{m/s}$	BONS	43,7 \pm 1,4	38,5 \pm 1,4	36,4 \pm 1,4	39,6 \pm 1,0 a
	RUINS	40,0 \pm 1,4	35,1 \pm 1,4	28,8 \pm 1,4	34,7 \pm 1,0 b
	Média	41,8 \pm 1,0 A	36,8 \pm 1,0 B	32,6 \pm 1,0 C	
VAP, $\mu\text{m/s}$	BONS	55,7 \pm 2,0	56,3 \pm 2,0	57,5 \pm 2,0	56,5 \pm 1,5 a
	RUINS	52,2 \pm 2,0	51,9 \pm 2,0	46,6 \pm 2,0	50,2 \pm 1,5 b
	Média	53,9 \pm 1,4	54,1 \pm 1,4	52,1 \pm 1,4	
BCF, Hz	BONS	23,6 \pm 0,6	22,7 \pm 0,6 x	21,4 \pm 0,6 x	22,5 \pm 0,4
	RUINS	22,4 \pm 0,6 X	19,3 \pm 0,6 Yy	15,2 \pm 0,6 Zy	19,0 \pm 0,4
	Média	23,0 \pm 0,4	21,0 \pm 0,4	18,3 \pm 0,4	
ALH	BONS	1,10 \pm 0,04 X	1,19 \pm 0,04 XY	1,29 \pm 0,04 Y	1,19 \pm 0,04
	RUINS	1,07 \pm 0,04 X	1,19 \pm 0,04 Y	1,16 \pm 0,04 XY	1,14 \pm 0,04
	Média	1,09 \pm 0,03	1,19 \pm 0,03	1,22 \pm 0,03	
STR	BONS	0,79 \pm 0,01	0,69 \pm 0,01	0,66 \pm 0,02	0,70 \pm 0,01
	RUINS	0,77 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,63 \pm 0,02	0,70 \pm 0,01
	Média	0,78 \pm 0,01 A	0,68 \pm 0,01 B	0,63 \pm 0,01 C	
LIN	BONS	0,37 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01
	RUINS	0,36 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01
	Média	0,36 \pm 0,01 A	0,31 \pm 0,01 B	0,28 \pm 0,01 C	
WOB	BONS	0,48 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01
	RUINS	0,46 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01
	Média	0,47 \pm 0,01 A	0,45 \pm 0,01 B	0,44 \pm 0,01 C	

Valores expressos como LSmeans \pm erro padrão da média.

a, b na coluna: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

A, B e C na linha: indicam diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($P < 0,05$).

x, y na coluna: indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), dentro de cada tempo de armazenamento.

X, Y na linha: indicam diferença significativa entre os tempos de armazenamento ($P < 0,05$), dentro de cada tratamento.

BONS: machos cujas doses com antimicrobianos apresentaram, nas 120 h de armazenamento, motilidade progressiva superior a 75% em todas as coletas.

RUINS: machos cujas doses com antimicrobianos apresentaram, nas 120 h de armazenamento, motilidade progressiva inferior a 75% em todas as coletas.

VCL= velocidade percorrida do trajeto real; VSL= velocidade percorrida do trajeto em linha reta; VAP= velocidade percorrida do trajeto médio; BCF= frequência com que o trajeto real cruza com o trajeto médio; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; STR= retilinearidade (VSL/VAP); LIN= linearidade (VSL/VCL); WOB= oscilação (VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio).

Após a incubação das amostras a 38 °C por 30, 120 e 300 min (Tabela 8), não foram observados efeitos da categoria dos machos sobre as motilidades total e progressiva ($P=0,98$). Também não foi observado efeito da interação entre categoria e tempo de incubação ($P>0,05$). Houve efeito do tempo de incubação ($P<0,0001$), sendo observada redução das motilidades aos 300 min. Os parâmetros de cinética não foram influenciados pela categoria dos machos e nem pela interação entre categoria e tempo de incubação ($P>0,10$), havendo efeito apenas para o tempo de incubação (dados não apresentados).

Tabela 8. Motilidade espermática de doses com antimicrobianos armazenadas a 5 °C por 120 h e submetidas a teste de termorresistência de 30, 120 e 300 min de incubação a 38 °C, em categorias de machos classificados de acordo com a sensibilidade ao resfriamento

Variáveis	Categoria	Tempo de incubação			Média
		30 min	120 min	300 min	
Motilidade Total, %	BONS	86,6±1,4	86,5±1,5	74,0±3,6	83,1±1,8
	RUINS	84,5±1,5	85,9±1,5	78,4±3,2	83,1±1,8
	Média	85,6±1,0 A	86,2±1,1 A	76,3±2,4 B	
Motilidade Progressiva, %	BONS	81,6±1,6	81,8±1,7	66,9±3,9	77,4±2,0
	RUINS	78,4±1,8	81,0±1,7	72,1±3,6	77,4±2,0
	Média	80,0±1,2 A	81,4±1,2 A	69,6±2,6 B	

Valores expressos como LSmeans ± erro padrão da média.

A, B indicam diferença significativa entre os tempos de incubação a 38 °C ($P<0,05$).

BONS: machos cujas doses com antimicrobianos apresentaram, nas 120 h de armazenamento, motilidade progressiva superior a 75% em todas as coletas.

RUINS: machos cujas doses com antimicrobianos apresentaram, nas 120 h de armazenamento, motilidade progressiva inferior a 75% em todas as coletas.

6 DISCUSSÃO

O ejaculado suíno frequentemente apresenta contaminação bacteriana e, por isso, os antimicrobianos são constituintes essenciais para qualquer diluente, a fim de prolongar a longevidade espermática *in vitro* (ALTHOUSE e LU, 2005). Entretanto, com o aumento da resistência bacteriana a esses antimicrobianos, o desenvolvimento de medidas alternativas é fundamental. Uma delas seria o armazenamento das doses em baixas temperaturas, por controlar o crescimento bacteriano, desde que seja mantida a qualidade espermática. Nesse contexto, os resultados do presente estudo demonstraram a possibilidade de armazenar doses de sêmen suíno em temperaturas de 5 e 10 °C, inferiores às praticadas atualmente (15-18 °C). Isto porque, apesar de existir efeito da temperatura de armazenamento sobre parâmetros espermáticos, como motilidade e percentual de acrossomas normais, estes ainda se mantiveram acima de níveis mínimos recomendados para a utilização do sêmen para inseminação (FLOWERS, 1997; JOHNSON et al., 2000; FEITSMA, 2016).

No experimento 1, os resultados de motilidade total e progressiva evidenciaram que doses armazenadas a 17 °C tem desempenho superior às armazenadas a 10 °C por até 72 h, se igualando nas 120 h, e superior às mantidas a 5 °C ao longo das 120 h de armazenamento. Schmid et al. (2013) observaram redução de motilidade total e de velocidade espermática ao longo de 96 h de armazenamento, quando compararam doses armazenadas a 17 °C com àquelas mantidas a 10 e 5 °C, independentemente do diluente empregado (BTS ou Androstar Plus). Embora, no trabalho de Schmid et al. (2013), a motilidade total nas doses armazenadas a 5 °C, quando diluídas com BTS, tenha sido inferior a 70%, ao usar o diluente Androstar Plus esse parâmetro se manteve superior a 80%. Cabe ressaltar que, no presente estudo, a motilidade total após 120 h de armazenamento a 5 °C esteve acima de 77%. Apesar de ser inferior àquelas armazenadas a 10 e 17 °C, o valor alcançado a 5 °C é satisfatório, se comparado com outros estudos (CASAS; ALTHOUSE, 2013; KATZER et al., 2004; MAXWELL; JOHNSON, 1997; PURSEL et al., 1973) e está acima dos padrões mínimos exigidos (JOHNSON et al., 2000). É importante pontuar que, em outros estudos, a diferença na motilidade total entre as amostras mantidas a 17 e a 10 °C (ALTHOUSE et al., 1998), ou a 15 e a 10 °C (PAULENZ et al., 2000), ou a 17 e a 5 °C (KATZER et al., 2004) também já apareceram após mantidas 24 h na temperatura de armazenamento e perduraram por toda a avaliação. No segundo experimento, enquanto a motilidade total apenas diferiu entre 17COM e

5SEM, a progressiva foi inferior nos dois tratamentos mantidos a 5 °C em comparação com 17 °C. A inferioridade da motilidade espermática nas amostras mantidas em temperaturas de armazenamento mais baixas pode ser explicada por alterações que acontecem no espermatozoide suíno devido ao choque térmico pelo frio. Dentre elas destaca-se a redução da atividade mitocondrial, por haver alteração dos mecanismos de transmissão de energia por toda a cauda, o que cursa com mudanças nos padrões de motilidade espermática (FLORES et al., 2010). Outro aspecto importante do experimento 1 foi a redução na motilidade (total e progressiva) das amostras mantidas a 17 °C, quando não foram adicionados antimicrobianos ao diluente. Esse fato pode ter sido resultante da maior contaminação bacteriana presente nestas amostras. De fato, nas doses do tratamento 17SEM, as motilidades (total e progressiva) às 120 h de armazenamento foram maiores em doses com baixa contaminação quando comparadas às doses com alta contaminação. Esse efeito pode ser devido ao fato de que as bactérias podem levar à aglutinação espermática, além de possuírem efeito espermatotóxico relacionado à perturbação direta da célula espermática (ALTHOUSE et al., 2000; KUSTER; ALTHOUSE, 2016).

Quanto à diferença de motilidade observada entre machos BONS e RUINS, nas 120 h de armazenamento, a mesma era esperada, uma vez que a separação dos machos foi feita com base nesse critério. No entanto, foi possível notar que as motilidades (total e progressiva) dos machos classificados como RUINS foram reduzindo ao longo do armazenamento, enquanto que os machos BONS foram capazes de manter valores mais estáveis durante as 120 h de armazenamento. A diferença dos machos foi observada para algumas características de cinética espermática, como VCL, VSL, VAP, BCF e ALH. A diferença na resistência dos machos frente às baixas temperaturas pode ser mediada pela composição do plasma seminal. No trabalho de Reis (2002), houve a tentativa de reverter a sensibilidade ao resfriamento a 17 °C de machos com alta sensibilidade, adicionando 10% de plasma seminal de machos com menor sensibilidade, mas os resultados não foram satisfatórios, pois a centrifugação utilizada causou danos às células espermáticas. Entretanto, ao congelar amostras de sêmen em diluente suplementado com 5% de plasma seminal de machos sabidamente BONS congeladores de sêmen, foi observada melhora tanto em motilidade, quanto em viabilidade após descongelamento (HERNÁNDEZ et al., 2007). Além da composição do plasma seminal, pode ser que as diferenças entre machos BONS e RUINS sejam devidas à composição da membrana plasmática, particularmente com relação à proporção de ácidos graxos polinsaturados uma vez que o aumento nos

níveis de ácido docosapentaenoico (DPA; 22:5, n-6) e ácido docosaheptaenoico (DHA; 22:6, n-3), na membrana espermática pós-descongelamento, foi associado com maior número de espermatozoides que sobreviveram ao congelamento e descongelamento (WATERHOUSE et al., 2006).

Ao final do armazenamento, nas 120 h, as amostras de sêmen diluído foram submetidas ao teste de termorresistência para avaliar a competência funcional das células espermáticas em manter sua fertilidade e serem capazes de sobreviver no trato reprodutivo da fêmea pós-IA (SCHULZE et al., 2013; TARDIF et al., 1999). Nos diferentes momentos em que o TTR foi realizado no experimento 1, não houve diferença na motilidade (total e progressiva) frente às diferentes temperaturas de armazenamento das doses, nem mesmo sob incubação de 300 min a 38 °C. Cabe ressaltar que a motilidade total alcançada após o TTR, independentemente da temperatura de armazenamento, esteve acima de 80%. Estes valores superam os observados por Schulze et al. (2015c), que foram de no máximo 70,9% ao final dos 300 min de incubação a 38 °C, em doses armazenadas por 120 h a 17 °C. Entretanto, para outros parâmetros de cinética tais como STR, LIN e WOB, o estresse da incubação por 30 min já foi suficiente para reduzir os valores nas amostras mantidas a 5 e 10 °C em comparação às mantidas a 17 °C. As motilidades total e progressiva nas doses diluídas com antimicrobianos e armazenadas a 17 °C tiveram desempenho superior após o TTR do que as mantidas a 5 °C. Entretanto, a diferença entre as temperaturas de armazenamento deixou de existir para as amostras sem antimicrobianos. É provável que o estresse térmico da incubação tenha revelado danos nas células espermáticas que sobreviveram ao armazenamento, sendo estes danos causados pelas condições inadequadas do meio, decorrentes da maior contaminação bacteriana presente nas amostras sem antimicrobiano e armazenadas a 17 °C (FISER et al., 1991). No experimento 2, apesar dos machos terem sido classificados pela diferença de motilidade nas 120 h de armazenamento, os BONS não apresentaram melhor resistência à incubação, no TTR, e as categorias já foram semelhantes a partir dos 30 min a 38 °C. O motivo de não haver diferença entre as categorias durante o TTR pode ser porque existem diferenças entre machos e um mesmo macho pode ter ejaculados com diferenças na habilidade dos espermatozoides em suportar as diferentes técnicas de processamento do sêmen (PARRILLA et al., 2012). Além disso, no experimento 2, assim como no trabalho de Parrila et al. (2012), os resultados demonstram que a resposta obtida a uma dada avaliação (motilidade progressiva durante o armazenamento) não é capaz de prever a resposta para outra (motilidades após TTR). Outra explicação poderia ser o

número de ejaculados (repetições) considerados para a separação dos machos no experimento 2, pois, segundo Kennedy e Wilkins (1984), para ter uma correlação de aproximadamente 0,8 com a verdadeira habilidade de produção de sêmen e qualidade espermática de um macho seriam necessários de 9 a 15 ejaculados.

Outro efeito advindo do choque térmico pelo frio é a desestabilização das membranas celulares, em que ocorre lateralização de algumas proteínas como canais de íons por separação de fase de lipídeos, afetando a permeabilidade das mesmas (YESTE, 2017). A integridade de membrana acrossomal foi prejudicada pelas baixas temperaturas de armazenamento, em ambos os experimentos. Outros autores também encontraram menor número de acrossomas normais para as doses armazenadas a 10 °C do que para as mantidas a 15, 20 ou 25 °C (PAULENZ et al., 2000) e armazenadas a 5 °C do que para as armazenadas a 12 °C, com ou sem período de incubação, e a 17 °C (KATZER et al., 2001a). Contudo, no trabalho de Paulenz et al. (2000), provavelmente houve um resfriamento rápido, bem como a falta de período de adaptação antes do resfriamento, uma vez que a partir das 24 h de armazenamento, o percentual de acrossomas normais já passou a ser inferior a 60%. Ao testar temperaturas de 8, 10, 12, 14 e 17 °C, Althouse et al. (1998) não verificaram diferenças para o percentual de acrossomas normais, nas 48 h, e propuseram que isto poderia ser explicado pela presença de albumina sérica bovina (BSA) na formulação do diluente usado (Androhep), pela taxa de diluição, pela taxa de resfriamento ou, ainda, pelo método de análise. Apesar da integridade do acrossoma ter sido afetada pelo armazenamento em baixa temperatura, valores acima de 93,5% de acrossomas normais observados após 120 h de armazenamento a 5 °C, em ambos os experimentos, estão próximos de 90%, observado ao final do armazenamento por 48 h a 8 °C (ALTHOUSE et al., 1998) e acima de 81,3%, observado por Katzer et al. (2004) ao final do armazenamento de 120 h a 5 °C (24 h a 17 °C + 96 h a 5 °C).

A redução no percentual de células com membrana plasmática íntegra observada nas doses mantidas a 10 e 5 °C, no experimento 1, corrobora resultados de outros estudos (GACZARZEWICZ et al., 2015; PETRUNKINA et al., 2005). Porém, em estudo utilizando BTS e Androstar Plus® foram observados padrões diferentes relacionados à integridade de membrana – ao usar BTS, o percentual caiu à medida em que diminuiu a temperatura de armazenamento de 17 °C para 10 °C e de 10 °C para 5 °C; já ao usar Androstar Plus, só houve diferença das amostras mantidas a 5 °C para com as demais (SCHMID et al., 2013). Ainda, no estudo de Katzer et al. (2005), as amostras diluídas em BTS e mantidas a 5 °C, após um período de adaptação ou taxa de resfriamento lenta,

apresentaram integridade de membrana inferior às mantidas a 17 °C, apenas a partir das 72 h de armazenamento. A contradição entre os resultados do presente estudo e outros (KATZER et al., 2005; SCHMID et al., 2013) pode ser decorrente dos diferentes diluentes empregados no que se refere ao efeito protetor às células espermáticas ao resfriamento. Sabe-se que frente ao choque térmico pelo frio, há mudanças semelhantes à capacitação prematura e desestabilização da membrana espermática (PETRUNKINA et al., 2005). Embora o diluente utilizado tenha sido o mesmo para ambos os experimentos do presente estudo, o fato da integridade de membrana não ter sido afetada pelo abaixamento de temperatura, no experimento 2, mostra que diluentes que proporcionam um maior grau de proteção à membrana espermática podem minimizar os efeitos de desestabilização de membrana. O diluente empregado não tem divulgação pública de sua formulação, mas o avanço tecnológico no desenvolvimento desses produtos é bastante notório. Segundo Knox (2016), as novas gerações de diluentes de longa duração possuem composição aperfeiçoada em termos de agentes tamponantes, antioxidantes e antimicrobianos. Nesse sentido, pode-se explicar as diferenças nos percentuais alcançados no presente estudo para as amostras mantidas a 5 °C, quando comparados aos relatados anteriormente.

No experimento 1, o pH aumentou ao longo do armazenamento de 120 h nas doses armazenadas a 5 e 10 °C independentemente de terem sido ou não diluídas com antimicrobianos e, também, nas doses armazenadas a 17 °C e diluídas com antimicrobianos. No experimento 2, em todos os tratamentos ocorreu aumento do pH ao longo do armazenamento, sendo o das doses mantidas a 5 °C sem antimicrobianos superior ao das demais. A alcalinização provavelmente decorre da perda de CO₂ do sêmen diluído para o compartimento de ar que é inevitavelmente formado dentro da embalagem da dose inseminante, explicado pela presença de um sistema tampão no diluente (VYT et al., 2007) e é comumente observada ao longo do período de armazenamento das doses (MENEGAT et al., 2017; SCHULZE et al., 2015c; VYT et al., 2004). No entanto, a queda acentuada de pH, entre 72 e 120 h, nas doses diluídas sem antimicrobianos e armazenadas a 17 °C, no experimento 1, pode ser devida à maior contaminação bacteriana dessas amostras. Doses com maior contaminação bacteriana têm acidificação do pH ao longo do armazenamento (ALTHOUSE et al., 2000; GOLDBERG et al., 2017; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2014; SO et al., 2011) e sabe-se que essa temperatura de armazenamento não é suficiente para limitar o crescimento bacteriano como ocorre a 10 e 5 °C (KATZER et al., 2001b). Além disso, pode-se inferir que essa acidificação seja devido à peroxidação lipídica por espécies reativas de oxigênio, durante o

armazenamento, na presença de bactérias como a *E. coli* (SO et al., 2011). A queda do pH nas doses armazenadas a 17 °C sem antimicrobiano afetou negativamente a motilidade (total e progressiva), visto que foi observada correlação positiva entre o pH e motilidade das doses 17SEM às 120 h de armazenamento.

Além da viabilidade espermática de doses de sêmen suíno sob armazenamento hipotérmico, com e sem o uso de antimicrobianos, foi investigado o grau de contaminação bacteriana das mesmas, uma vez que as bactérias podem exercer efeito tóxico diretamente sobre a célula espermática (ALTHOUSE; LU, 2005). No experimento 1, as doses diluídas com antimicrobianos tiveram menor contaminação bacteriana do que as diluídas sem antimicrobianos, independentemente da temperatura de armazenamento, mostrando que boa parte da população bacteriana presente nas amostras foi sensível ao efeito dos antimicrobianos usados no diluente (ampicilina e apramicina). A alta contagem de UFC nas amostras armazenadas a 17 °C, sem antimicrobiano, pode ser resultante da alta contaminação bacteriana do sêmen *in natura* (14461,6 UFC/mL) visto que, em outros estudos, realizados em centrais de inseminação artificial no Brasil, foram relatadas contagens de 1051 a 4778 UFC/mL (BENNEMANN, 1998) e de 730 a 2986 UFC/mL (GOLDBERG et al., 2017) em amostras *in natura*. A menor contagem de UFC nas amostras diluídas sem antimicrobianos e mantidas a 5 e 10 °C decorre, hipoteticamente, da variação nos intervalos de gerações bacterianas que são dependentes de tempo e temperatura (ALTHOUSE et al., 2008), ou seja, com menor temperatura de armazenamento houve aumento no intervalo entre gerações da população bacteriana presente nas doses inseminantes. Katzer et al. (2001b) também observaram desaceleração no incremento da população bacteriana ao armazenarem doses de sêmen suíno a 5 °C, quando comparadas às mantidas a 17 °C. Além disso, ainda que a temperatura de 17 °C esteja abaixo da considerada ótima para as bactérias comumente presentes nas doses de sêmen suíno, que são majoritariamente mesófilas (ALTHOUSE et al., 2008), ela não foi satisfatória em reduzir o crescimento bacteriano. Dessa forma, o crescimento bacteriano nessas amostras pode ter levado à acidificação do pH do meio como descrito acima e, também, ao comprometimento de parâmetros espermáticos como a motilidade. A contagem de mesófilos também foi maior na ausência do que na presença de antimicrobianos, nas doses de sêmen mantidas a 5 °C, no experimento 2. Assim, fica evidente que para armazenar doses sem o uso de antimicrobianos, mesmo em condições hipotérmicas, os cuidados com a higienização durante todo o processo de produção das doses inseminantes passam a ser de extrema importância, posto que as baixas

temperaturas de armazenamento testadas, ainda que tenham reduzido o crescimento bacteriano, não foram suficientes para o inibir por completo.

Há décadas é conhecido o papel do período de adaptação prévio ao armazenamento do sêmen suíno a temperaturas inferiores a 15 °C para aquisição, por parte da célula espermática, de certa resistência ao dano ocasionado pelo choque térmico pelo frio (MAXWELL; JOHNSON, 1997; PURSEL et al., 1973). Porém, a velocidade de resfriamento adequada até atingir tal temperatura de armazenamento ainda é desconhecida. Desta forma, em nosso estudo, antes das doses serem armazenadas a 5 °C, elas permaneceram entre 22-24 °C por 6 h, o que gerou uma velocidade de resfriamento de 1,9 °C/h (Experimento 1). As doses de sêmen apenas atingiram a temperatura final de armazenamento após 12 h dentro da conservadora (a 5 °C), com uma velocidade de resfriamento de 1,6 °C/h (queda de 7,3 °C na primeira hora). Durante o período de adaptação, o espermatozoide é capaz de adquirir do meio componentes benéficos capazes de sustentar a arquitetura lipídica da membrana. Além disso, o período de adaptação minimiza a ocorrência de alterações na fluidez da membrana plasmática associadas aos danos do choque térmico pelo frio (BUTLER et al., 1975; CASAS; ALTHOUSE, 2013). Outros autores obtiveram menores percentuais de motilidade e acrossomas normais em doses que foram diretamente armazenadas a 5°C do que quando passaram por resfriamento lento, passando de 35 para 25 °C, depois para 15 °C e, por fim, para 5 °C, em um período de 80 min (WEITZE et al., 2000). Entretanto, Grossfeld et al. (2016), utilizando período de adaptação de 6 h antes de armazenar as doses a 5 °C, não encontraram diferença na motilidade progressiva e no percentual de acrossomas normais ao longo do armazenamento de 72 h, em doses diluídas com antimicrobianos a 17 °C e em doses sem antimicrobianos a 5 °C. Esse contraste com os resultados do experimento 2 pode ser decorrente de diferenças entre as curvas de resfriamento, apesar dos protocolos semelhantes. Em curvas de refrigeração mais lenta, Katzer et al. (2005) obtiveram resultados de motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossomal semelhantes entre amostras incubadas 24 h a 17 °C ou que passaram por queda lenta de temperatura até 5 °C. Contudo, em nosso estudo, os resultados de motilidade, integridade de membrana e acrossomas normais foram bem superiores aos observados por esses autores, mesmo com taxa de resfriamento mais lenta de 0,07 °C/h, com queda de 6 °C na primeira hora. Essa contradição entre os resultados alcançados, possivelmente, é advinda da diferença entre os diluentes usados nos experimentos, uma vez que os autores usaram o

BTS e, em nosso estudo, foi usado o Androstar Premium®, que possui estabilizadores de membrana e antioxidantes.

Em conclusão, a qualidade espermática de doses de sêmen suíno foi afetada negativamente pelas baixas temperaturas de armazenamento. No entanto, parâmetros como percentual de células móveis e de acrossomas normais ao final do armazenamento de 5 dias ainda se mantiveram em níveis aceitáveis para a prática da inseminação artificial. A redução do crescimento bacteriano, mas não sua inibição, em baixas temperaturas de armazenamento, alerta para o fato de que a não utilização de antimicrobianos dependerá de rigorosa higienização do processo de produção das doses inseminantes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processamento do sêmen suíno, desde a coleta do ejaculado, passando pela adição do diluente até o envase, leva inevitavelmente à contaminação bacteriana das doses inseminantes. As bactérias encontram no diluente e nas temperaturas relativamente altas de armazenamento das doses um ambiente propício para o seu crescimento. Por vezes, a contaminação bacteriana resulta em prejuízos à qualidade das doses, em termos de motilidade espermática e porcentagem de acrossomas normais, além de já ter sido correlacionada negativamente com o tamanho da leitegada. Sendo assim, a adição de antimicrobianos às doses de sêmen é um procedimento usual. Contudo, a crescente preocupação da indústria de inseminação artificial de suínos, com a ocorrência de resistência bacteriana, tem impulsionado pesquisas voltadas ao desenvolvimento de alternativas ao uso de antimicrobianos convencionais.

Nosso estudo vem ao encontro dessas pesquisas e demonstra a possibilidade de armazenar o sêmen suíno a 5 °C, apesar da qualidade espermática ter sido afetada negativamente pela temperatura de armazenamento. No entanto, existem diferenças individuais e, no presente estudo, foi comprovado que determinados machos têm baixa sensibilidade ao armazenamento a 5 °C. Isto significa que a otimização do uso de sêmen resfriado a 5°C dependerá da escolha de machos cujos espermatozoides mantenham a viabilidade em baixas temperaturas, o que poderá ser melhor explorado em estudos futuros. Além disso, a retirada dos antimicrobianos das doses mantidas sob baixas temperaturas também se mostrou possível, mas para que seja praticável na rotina das centrais de processamento de sêmen será necessário incorporar práticas de higiene mais rigorosas, tanto na área de coleta quanto no laboratório de processamento das doses.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. S. C.; MORONI, J. L.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Impact of isothermic and bithermic dilution on quality of chilled boar sperm. **Animal Reproduction**, v. 12, n.4, p. 903-909, 2015.

ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 573-584, 2005.

ALTHOUSE, G. C.; KUSTER, C. E.; CLARK, S. G.; WEISIGER, R. M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1167-1176, 2000.

ALTHOUSE, G. C.; PIERDON, M. S.; LU, K. G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1317-1323, 2008.

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

BAILEY, J.L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251-1259, 2008.

BENNEMANN, P.E. Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil e o efeito da contaminação bacteriana sobre a qualidade espermática. 254 f. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 1998.

BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I. Inseminação Artificial em Suínos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: 2008. p. 125-144.

BORTOLOZZO, F.B.; MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. New artificial insemination technologies for swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 80-84, 2015.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; BORCHARDT NETO, G. Processamento e armazenamento das doses inseminantes. **Suinocultura em Ação – Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Palotti, cap.8. p. 91-105, 2005.

BRYLA, M.; TRZCINSKA, M. Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 157-163, 2015.

BUTLER, W.J.; ROBERTS, T.K. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p.183-187, 1975

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

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Introdução ao exame andrológico – Coleta e avaliação seminal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª edição. Belo Horizonte CBRA. cap.1. p.20-25, 2013.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

FEITSMA, H. Considerations for motility and morphology cutoff thresholds. **Proceedings of Midwest Boar Stud Managers Conference V**. Missouri, USA. p. 40-50, 2016.

FISER, P.S.; HANSEN, C.; UNDERHILL, L.; MARCUS, G.J. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 28, p. 454-459, 1991.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. **Theriogenology**, v. 74, p. 354-363, 2010.

FLOWERS, W. L. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. **Proceedings of Midwest Boar Stud Managers Conference II**. Missouri, USA. p. 14-21, 2004.

FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 52, p. 67-78, 1997.

GACZARZEWICZ, D.; UDALA, J.; PIASECKA, M.; BLASZCZYK, B.; STANKIEWICZ, T. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 582-594, 2015.

GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n.2, p. 17-27, 2003.

GOLDBERG, A.M.G.; ARGENTI, L.E.; FACCIN, J.E.; LINCK, L.; SANTI, M.; BERNARDI, M.L.; CARDOSO, M.R.I.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 362-367, 2013.

GOLDBERG, A.M.G.; CARDOSO, M.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. The impact of bacterial contamination of the ejaculate and extender

on the quality of swine semen doses. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.5, p. 3095-3104, 2017.

GROSSFELD, R.; PERALTA, W.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Antibiotic-free hypothermic storage of boar semen in Androstar +5 extender results in similar fertility results compared to semen stored at 17 °C in extender with antibiotic content. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 125, 2016.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. **Journal of Andrology**, v. 28, n.5, p. 689-697, 2007.

HOOD, R.D.; FOLEY, C.W.; MARTIN, T.G. Effects of cold shock, dilution, glycerol and dimethyl sulfoxide on cation concentrations in porcine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 30, n.1, p. 91-94, 1970.

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.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Qualidade de sêmen suíno resfriado sob influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. **Ars Veterinária**, v. 20, n.2, p. 233-241, 2004.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5°C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 138-144, 2005.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; PADILHA, A.P.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; COSTI, G.; DIEHL, G.N. Diferentes temperaturas e diluentes no resfriamento de sêmen suíno. **Anais do X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**. Porto Alegre, Brasil. p. 243-244. 2001a.

KATZER, L. H.; BERNARDI, M. L.; SILVA, L.E.da; SCHWARZ, P.; CARDOSO, M.; BORTOLOZZO, F.P.; PADILHA, A.P.; WENTZ, I. Comportamento de populações bacterianas presentes no sêmen suíno resfriado em diferentes temperaturas. **Anais do X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**. Porto Alegre, Brasil. p. 247-248. 2001b.

KENNEDY, B.W.; WILKINS, J.N. Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 64, p. 833-843, 1984.

KNOX, R.V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, p. 83-93, 2016.

KUSTER, C. E.; ALTHOUSE, G. C. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. **Theriogenology**, v. 85, p. 21-26, 2016.

LÓPEZ RODRIGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN SOOM, A.; MAES, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n.5, p. 63-66, 2012.

MARTÍN, L.O.M.; MUÑOZ, E.C.; CUPERE, F.; VAN DRIESSCHE, E.; ECHEMENDIA-BLANCO, D.; RODRÍGUEZ, J.M.M.; BEECKMANS, S. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 95-104, 2010.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, v. 48, p. 209-219, 1997.

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

MENEZES, T.A.; MELLAGI, A.P.G.; OBERRATHER, K.; FIÚZA, A.T.L.; PASCHOAL, A.F.L.; SANTOS, J.T.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Qualidade de doses de sêmen suíno armazenadas à 17 °C sem período prévio de estabilização em temperatura ambiente. **Anais Porkexpo**. Foz do Iguaçu, Brasil. 2016.

MORRELL, J.M.; WALLGREN, M. Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. **Pathogens**, v.3, p. 934-946, 2014.

PARRILLA, I.; OLMO, D.; SIJSES, L.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J. Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 66-73, 2012.

PAULENZ, H.; KOMMISRUDE, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 83-87, 2000.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; WEITZE, K.F.; BEYERBACH, M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, p. 2278-2299, 2005.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; BUSSALLEU, E.; GARCIA-BONAVILA, E.; BONET, S.; YESTE, M. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17 °C. **Animal Reproduction Science**, v. 148, p. 72-82, 2014.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v. 34, p. 278-283, 1972.

PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L. L.; JOHNSON, L. A. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5 °C. **Journal of Animal Science**, v. 37, n.3, p. 785-789, 1973.

REIS, G. Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético. 91 f. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2002.

RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; HENNING, H.; WABERSKI, D. Quality control of boar sperm processing: implications from European AI centers and two spermatology reference laboratories. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 1-4, 2015.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT User's Guide**. Release 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary, 2005.

SCHMID, S.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A.M.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Response to capacitating stimuli indicates extender-related differences in boar sperm function. **Journal of Animal Science**, p. 5018-5025. 2013.

SCHULZE, M.; AMMON, C.; RÜDIGER, K.; JUNG, M.; GROBBEL, M. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. **Theriogenology**, v. 83, p. 430-437, 2015a.

SCHULZE, M.; DATHE, M.; WABERSKI, D.; MÜLLER, K. Liquid storage of boar semen: current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v.85, n.1, p. 39-46, 2016.

SCHULZE, M.; GROBBEL, M.; MULLER, K.; JUNKES, C.; DATHE, M.; RUDIGER, K.; JUNG, M. Challenges and limits using antimicrobial peptides in boar semen preservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 5-10, 2015b.

SCHULZE, M.; HENNING, H.; RÜDIGER, K.; WALLNER, U.; WABERSKI, D. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. **Theriogenology**, v. 80, p. 990-998, 2013.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50. p. 684-687. 2015c.

SO, K.M.; SA, S.J.; KIM, H.J.; CHUNG, K.H.; JUNG, B.Y.; SON, J.S.; KIM, I.C. Effects of *Escherichia coli* contamination on extended porcine semen parameters. **Reproductive and Developmental Biology**, v. 35, n.4, p. 479-483, 2011.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.P.; CORMIER, N.; BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, p. 447-459, 1999.

UBEDA, J.L.; AUSEJO, R.; DAHMANI, Y.; FALCETO, M.V.; USAN, A.; MALO, C.; PEREZ-MARTINEZ, F.C. Adverse effects of members of the *Enterobacteriaceae* family on boar sperm quality. **Theriogenology**, v. 80, p. 565-570, 2013.

VYT, P.; MAES, D.; DEJONCKHEERE, E.; CASTRYCK, F.; VAN SOOM, A. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 8-12, 2004.

VYT, P.; MAES, D.; SYS, S.U.; RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A. Air contact influences the pH of extended porcine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 218-220, 2007.

WABERSKI, D. Consequences of the use of antibiotics in boar semen doses. **Anais do X Simpósio Internacional de Suinocultura**. Porto Alegre, Brasil. p. 1-3. 2017.

WABERSKI, D.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A. M. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46(Suppl. 2), p. 45-48, 2011.

WATERHOUSE, K.E.; HOFMO, P.O.; TVERDAL, A.; MILLER JR, R.R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. **Reproduction**, v. 131, p. 887-894, 2006.

WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n.1, p. 135-140, 1996.

WEITZE, K. F.; WEBER, H.; WABERSKI, D. Influence of incubation time and cooling rate on chilling sensitivity of diluted boar semen. **Proceedings of IV International Conference on Boar Semen Preservation**. Beltsville, USA. p. 264. 2000.

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

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

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. 14-77-1488, 2000.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. **Animal Reproduction**, v. 14, n.1, p. 69-81, 2017.