

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

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO A 37°C DE DOSES DE SÊMEN  
RESFRIADAS E DILUÍDAS EM DOIS DIFERENTES DILUENTES NA ANÁLISE DE  
MOTILIDADE ESPERMÁTICA NO SISTEMA CASA**

**Autor: Júlia Linck Moroni**

**PORTO ALEGRE  
2015/2**

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

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO A 37°C DE DOSES DE SÊMEN  
RESFRIADAS E DILUÍDAS EM DOIS DIFERENTES DILUENTES NA ANÁLISE DE  
MOTILIDADE ESPERMÁTICA NO SISTEMA CASA**

**Autor: Júlia Linck Moroni**

**Orientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo**

**Coorientador: Ana Paula Gonçalves Mellagi**

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

**PORTO ALEGRE  
2015/2**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Roseli e Augusto, por serem minha constante fonte de inspiração e meu alicerce. Por nunca medirem esforços e por sempre estarem ao meu lado na busca dos meus sonhos. Obrigada por apoiarem cada decisão e por terem vibrado ao meu lado cada conquista. Devo tudo a vocês.

À minha tia Estela por ter sido meu porto seguro durante todos esses anos em Porto Alegre. Obrigada pelo incentivo, pelas conversas e conselhos. És um exemplo.

Às minhas amigas e colegas que dividiram cada suspiro desses 6 anos de Faculdade. Por estarem sempre do meu lado, pela parceria e amizade incondicional: Carine, Júlia Xanxerê, Luiza, Carol M. e Malu. A Favet não teria sido a mesma sem vocês! Gostaria de agradecer especialmente à minha amiga Carol R., pelo companheirismo, apoio e paciência durante o experimento. Obrigada por tudo!

Aos professores do Setor de Suínos pelo aprendizado e principalmente ao meu orientador de Trabalho de Conclusão de Curso, Fernando P. Bortolozzo, pela possibilidade de realizar esse trabalho.

À minha coorientadora Ana Paula Mellagi pelas incontáveis horas em que estive ao nosso lado auxiliando na realização desse projeto. Obrigada pelo companheirismo e paciência! Esse projeto não seria possível sem a tua ajuda. Gostaria de agradecer também à Mari pelo apoio durante o período experimental.

Ao companheirismo e amizade dos colegas e amigos do Setor de Suínos que tornaram essa trajetória inesquecível: Karine, Beti, Thaís, João, Sato, Rafa Ulguim, Diogo M., Diogo F., Evandro, Ed, Márcio e aos demais que compartilharam conhecimento e alegrias durante esses anos de convivência.

Agradeço também aquelas que durante a caminhada profissional estiveram sempre guiando meus passos, servindo de exemplo trazendo crescimento pessoal e profissional: Maria Clara, Lídia e Milena.

## RESUMO

O uso do sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) teve um grande crescimento, tanto nos laboratórios comerciais de produção de sêmen quanto em trabalhos de pesquisa que investigam a influência dos diversos parâmetros de motilidades oferecidos pelo sistema. Entretanto, muitos aspectos precisam ser padronizados para uma correta avaliação. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do tempo de incubação de amostras seminais a uma temperatura de 37°C antes da análise motilidade espermática no sistema CASA. Foram utilizados 4 ejaculados de 5 machos suínos sexualmente maduros. Os ejaculados foram diluídos para a produção de doses em *split sample* em dois diluentes: curta duração (BTS) e em longa duração (Androstar® Plus). As doses foram armazenadas a  $17,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 72 horas e avaliadas de acordo com o tempo de incubação a 37°C (10, 20 e 30 minutos) e idade da dose (24 e 72 horas após a diluição). O diluente de longa duração teve resultado superior durante o período de armazenamento. Com relação à idade das doses, as amostras analisadas com 24h tiveram desempenho superior às doses com 72h de armazenamento. Não houve diferença estatística em relação ao tempo de incubação para as variáveis motilidade total, motilidade progressiva, motilidade local, DSL, VSL, raio e rotação. Entretanto, ao se avaliar parâmetros de motilidade como: motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade circular, DCL, DAP, VCL, VAP, BCF, STR, LIN e WOB, o tempo de incubação 10 minutos teve um desempenho superior aos demais. Desta forma, apesar dos parâmetros de motilidade total e progressiva não terem sido influenciados pelo tratamento, o tempo de incubação ideal para que as avaliações de motilidade sejam realizadas no sistema CASA é ao redor de 10 minutos, já que após esse intervalo algumas características de motilidade foram prejudicadas.

**Palavras-chave:** tempo de incubação; doses inseminantes; sistema CASA.

## **ABSTRACT**

*Using CASA system (Computer-Assisted Sperm Analysis) has greatly increased in both commercial laboratories of semen production and in research studies that investigate the influence of several parameters of motility from the system. However, many aspects should be standardized for proper evaluation. This study was conducted in order to evaluate the effect of incubation time under 37°C before sperm motility analysis using CASA system. Four ejaculates from 5 sexually mature boars were used. The samples were diluted in split sample into two extenders: short (BTS) and long term (Androstar<sup>®</sup> Plus). The insemination doses were stored at 17,3±0,5°C and evaluated according to the incubation time at 37°C (10, 20 and 30 minutes) and age of the dose (24 and 72 hours after dilution). The long term diluent had a better result during the storage period. Regarding the age of the dose, the samples with 24 hours of storage had superior performance than the doses of 72 hours of storage. There was no statistical difference in relation to the incubation time for the variables Total Motility, Progressive Motility, Local Motility, DSL, VSL, Radius and Rotation. However, some motility parameters, such as rapid motility, slow motility, circular motility, DCL, DAP, VCL, VAP, BCF, STR, LIN and WOB, in 10 minute treatment outperformed others. Thus, even though the total and progressive motility parameters were not influenced by the time of incubation, the ideal incubation time for the motility evaluations conducted with CASA system is around 10 minutes, since after this interval certain motility characteristics were negatively affected.*

*Keywords: incubation time; insemination doses; CASA system.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALH** = Amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio

**AOC** = Desvio médio de orientação da cabeça no trajeto curvilíneo

**BCF** = Frequência com que o traçado real cruza o traçado médio

**CASA** = *Computer-Assisted Sperm Analysis*

**CPS** = Central de Produção de Sêmen

**D** = Diluente

**DAP** = Distância percorrida do traçado médio

**DCL** = Distância percorrida do traçado curvilíneo

**DSL** = Distância percorrida do traçado em linha reta

**DxD** = Interação entre diluente e idade da dose

**IA** = Inseminação artificial

**ID** = Idade da dose

**IDxD** = Interação entre idade da dose e diluente

**IDxTI** = Interação entre idade da dose e tempo de incubação

**LIN** = Linearidade (VSL/VCL)

**MotCir** = Motilidade Circular

**MotLent** = Motilidade Lenta

**MotLoc** = Motilidade Local

**MotProgr** = Motilidade Progressiva

**MotRap** = Motilidade Rápida

**MotTot** = Motilidade Total

**STR** = Retilinearidade (VSL/VAP)

**TI** = Tempo de incubação

**VAP** = Velocidade do traçado médio

**VCL** = Velocidade do traçado curvilíneo

**VSL** = Velocidade do traçado em linha reta

**WOB** = Coeficiente de oscilação (VAP/VCL)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Parâmetros de avaliação de motilidade espermática.....14

### ARTIGO:

Figura 1 - Efeito do tempo de incubação após a diluição final, para as variáveis VCL e VAP (A), DCL e DAP (B), BCF (C), WOB (D) e motilidade rápida (E). Letras diferem ( $P<0,05$ ) entre o tempo de incubação..... 25

Figura 2 - Efeito da interação entre tempo de incubação e idade das doses após a diluição final, para as variáveis motilidade lenta (A), motilidade circular (B), LIN (C), STR (D). Letras diferem ( $P<0,05$ ) entre o tempo de incubação dentro de cada idade das..... 26

Figura 3 - Efeito da interação entre diluente e idade das doses após a diluição final, para as variáveis motilidade progressiva (A), motilidade rápida (B), motilidade local (C) e motilidade lenta (D). Letras diferem ( $P<0,05$ ) entre diluentes em cada idade das doses..... 27

Figura 4 - Efeito da interação entre diluente e idade das doses após a diluição final, para as variáveis DSL(A), DAP (B), VSL (C) e raio (D), SRT (E), LIN (F) e WOB (G). Letras diferem ( $P<0,05$ ) entre diluentes em cada idade das doses..... 28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de cinética celular medidas pelo sistema CASA..... 13

### ARTIGO:

Tabela 1 - Efeito (valor de p) do diluente, tempo de incubação, idade das doses, interação entre tratamento e idade das doses e interação entre idade das doses e diluente em relação às características de motilidade de doses inseminantes..... 24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
<b>2.1 Inseminação Artificial na Suinocultura</b> .....	10
<b>2.2 Avaliação de motilidade espermática</b> .....	10
2.2.1 Importância da avaliação .....	10
2.2.2 Avaliação subjetiva.....	11
2.2.3 Avaliação espermática computadorizada .....	11
<b>2.3 Fatores que influenciam a avaliação espermática computadorizada</b> .....	14
2.3.1 Concentração espermática .....	14
2.3.2 Temperatura.....	14
2.3.3 Tempo de incubação .....	15
<b>2.4 Diluição do sêmen para a produção de doses inseminantes</b> .....	15
<b>2.5 Efeito do armazenamento na motilidade espermática</b> .....	17
<b>3. ARTIGO: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO A 37°C DE DOSES DE SÊMEN RESFRIADAS E DILUÍDAS EM DOIS DIFERENTES DILUENTES NA ANÁLISE DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA NO SISTEMA CASA</b> .....	18
<b>3.1 Introdução</b> .....	18
<b>3.2 Materiais e Métodos</b> .....	18
<b>3.3 Análise estatística</b> .....	20
<b>3.4 Resultados e Discussão</b> .....	20
<b>3.5 Conclusão</b> .....	23
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	29
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>6. ANEXO</b> .....	33

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Com a expansão da utilização da inseminação artificial (IA) em suínos, o controle de qualidade na produção de doses inseminantes vem se tornando cada vez mais importante (DEJARNETTE, 2012). Atualmente, mais de 90% da IA na produção de suínos ao redor do mundo é realizada com o uso de diluentes que garantem um período viável das doses por até 5 dias de armazenamento a uma temperatura de 15 a 18°C (JOHNSON et al., 2000). Para que as doses utilizadas sejam de qualidade, a avaliação da motilidade é essencial no exame do ejaculado após o processamento das doses, podendo auxiliar no estabelecimento de correlações entre qualidade espermática e fertilidade (BROEKHUIJSE et al., 2011).

O sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) permite uma avaliação objetiva de diferentes características espermáticas como motilidade, velocidade, morfologia e concentração (VERSTEGEN et al., 2002). Juntamente com dados referentes à fertilidade a campo, o sistema tem impulsionado estudos que visam uma estimativa mais segura do potencial reprodutivo do macho suíno (BROEKHUIJSE et al., 2011). Entretanto, atualmente poucas informações estão disponíveis em relação às diferentes variáveis que podem afetar a avaliação do sêmen ou doses armazenadas. Dentre estes fatores é possível citar o tempo de incubação (tempo necessário para que os espermatozoides recuperem a motilidade) prévio às análises realizadas no sistema CASA.

O presente estudo, portanto, visa avaliar a influência do tempo de incubação a 37°C na motilidade espermática de doses de sêmen suíno 24 e 72 horas após sua produção, comparando diluentes de curta e longa duração. Desta forma, uma técnica padrão poderá ser estabelecida para o sistema CASA, garantindo que estudos comparativos entre diferentes laboratórios possam ser realizados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Inseminação Artificial na Suinocultura**

A IA em suínos tem aumentado exponencialmente nos últimos anos, tornando a eficiência reprodutiva em rebanhos suínos altamente dependente da capacidade fecundante dos espermatozoides de doadores de sêmen em centrais de produção de sêmen (CPS) (POPWELL; FLOWERS, 2004). Atualmente, mais de 90% da IA na produção de suínos ao redor do mundo é realizada com o uso de diluentes que garantem um período viável das doses por até 5 dias armazenadas de 15 a 18°C (JOHNSON et al., 2000). Embora uma pequena porcentagem também seja utilizada após o processo de congelamento para formação de bancos genéticos (TEJERINA et al., 2008).

A IA é atualmente considerada uma ferramenta essencial para otimizar a produtividade e maximizar o uso de machos de alto valor genético (DIDION, 2008). A identificação de reprodutores de alto potencial genético e fertilidade possibilita a maximização do uso destes animais em decorrência de que um maior número de doses inseminantes poderá ser obtido por ejaculado garantindo a eficiência produtiva e a rentabilidade do sistema (FOXCROFT et al., 2010). Portanto, para a implantação de um programa de sucesso a análise da qualidade do sêmen utilizado é um fator crítico (POPWELL; FLOWERS, 2004).

Métodos visuais podem ser utilizados como uma ferramenta para determinar a qualidade de um ejaculado. No entanto, trata-se de métodos subjetivos, suscetíveis a variações individuais. Conseqüentemente, o sistema CASA vem ocupando grande espaço na indústria visto que garante uma avaliação mais precisa (VERSTEGEN et al., 2002). A avaliação rotineira através de métodos subjetivos ou objetivos dos ejaculados utilizados para a preparação de doses têm possibilitado estimar a viabilidade de amostras seminais e, por conseguinte avaliar o potencial fertilizante de um macho, a fim de eliminar animais com baixa produtividade e fertilidade (FOXCROFT et al., 2010). Desta forma, é possível evitar o uso de ejaculados de baixa qualidade que possam vir a influenciar negativamente a fertilidade de um plantel após a IA (TEJERINA et al., 2008).

### **2.2 Avaliação de motilidade espermática**

#### **2.2.1 Importância da avaliação**

A motilidade espermática é considerada uma característica primária para a fertilização (LANGENDIJK et al., 2002) e alguns estudos com suínos tem descrito uma relação entre a motilidade espermática e o tamanho de leitegada através da aferição de motilidade a partir de

amostras diluídas (HOLT et al., 1997, GADEA et al., 2005). Em estudo realizado por Vyt et al. (2008) o percentual de espermatozoides móveis foi significativamente associado com o tamanho de leitegada (número total de leitões nascidos) e também com o número de nascidos vivos. Entretanto, é fundamental levar em conta que machos apresentam diferenças individuais, sendo possível perceber uma variabilidade em relação à estimativa de qualidade e fertilidade de um reprodutor ou de uma amostra (POPWELL; FLOWERS, 2004).

Atualmente, os ejaculados são discriminados de acordo com o percentual de espermatozoides móveis por amostra de sêmen. A partir da avaliação microscópica é possível classificar os ejaculados aptos ao uso para a produção de doses quando a motilidade é superior a 60% (BROEKHUIJSE et al., 2012). Esse valor é, portanto, o ponto de corte e referência para a seleção dos ejaculados a serem utilizados em CPS, visto que a fertilidade pode ser comprometida caso esse parâmetro não seja respeitado (FLOWERS, 1997). Sob o ponto de vista prático uma margem de segurança é adotada visando neutralizar falhas que possam vir a ocorrer na análise desta variável (BORTOLOZZO et al., 2005). Portanto, adota-se um mínimo de 70% de espermatozoides móveis como referência. Contudo, quando as doses forem utilizadas após 72h um valor mínimo de 80% deve ser adotado (ALTHOUSE, 2007).

A motilidade espermática, portanto, é de fundamental importância para prever o potencial do ejaculado (GADEA, 2005). Assim sendo, alguns métodos têm sido utilizados para avaliar esta característica.

### 2.2.2 Avaliação subjetiva

Tradicionalmente, a motilidade espermática é realizada por um técnico que categoriza o escore de motilidade espermática ao analisar o movimento através de um microscópio de contraste de fase (BROEKHUIJSE et al., 2011). Este método visual é utilizado como uma ferramenta para determinar a qualidade de um ejaculado (TEJERINA et al., 2008). Apesar de ser rápida e barata, esta técnica abre espaço para avaliações subjetivas e pessoais (também dependente do treinamento recebido pelos funcionários), o que explica a grande discrepância entre examinadores documentada em literatura (AMANN et al., 1989; YEUNG et al., 1997). Essa variação individual torna difícil estimar o efeito da motilidade espermática na fertilidade do rebanho (BROEKHUIJSE et al., 2011).

### 2.2.3 Avaliação espermática computadorizada

Quando avaliações subjetivas são realizadas em sêmen de humanos e animais variações de 30 a 60% foram relatadas em relação à estimativa dos parâmetros de motilidades dos mesmos ejaculados (VERSTEGEN et al., 2002). Uma das possibilidades para que a acurácia e a padronização das análises de motilidade espermática sejam realizadas é através da utilização do sistema CASA (AMANN; KATZ, 2004). O uso deste sistema foi primeiramente proposto por Dott e Foster há 20 anos e atualmente é o sistema mais utilizado para a avaliação de motilidade espermática (VERSTEGEN et al., 2002). As imagens obtidas permitem a análise de vários parâmetros, incluindo concentração, motilidade e alguns parâmetros de morfologia, principalmente relacionadas a defeitos de cabeça (VERSTEGEN et al., 2002).

Este sistema grava, através de uma câmera de vídeo, o caminho percorrido pelo espermatozoide em um dado período de tempo. O sinal captado é digitalizado e a informação processada pelo computador que reconstrói, em dado número de imagens, a trajetória de cada um dos espermatozoides. O sistema localiza um ponto individual (geralmente a cabeça) e também confere a presença de cauda e a velocidade que os espermatozoides atingem. Então, a partir de sucessivas imagens o sistema acompanha o deslocamento destes pontos e a trajetória dessas células é captada e computada (AMANN; WABERSKI, 2014). Através destas características, o sistema se torna apto a identificar diferentes padrões de movimento, considerados parâmetros cinéticos, como velocidade espermática e deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide, por exemplo. Finalmente as propriedades desses movimentos são analisadas por meio de algoritmos de processamento de imagem (VERSTEGEN et al., 2002).

A principal vantagem do sistema CASA é a possibilidade de realizar análises objetivas das amostras (TEJERINA et al., 2008) e a utilização de parâmetros idênticos para a avaliação de uma série de amostras. Além disso, o sistema permite determinar o exato valor de células espermáticas consideradas móveis e imóveis (BROEKHUIJSE et al., 2011). Em contrapartida, o uso deste sistema exige um alto investimento inicial e a necessidade de padronização e validações do sistema, que devem ser implementadas antes de qualquer análise ser iniciada (VERSTEGEN et al., 2002, LENZI A., 1997, TEJERINA et al., 2008). Adicionalmente, a avaliação com o uso do sistema CASA é suscetível às influências externas como consistência na análise pelo operador e manipulação do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002).

O movimento de espermatozoides normais caracteriza-se por um movimento retilíneo, progressivo e em plano único e com movimentos rápidos de cauda. No sistema CASA qualquer mudança sutil nas características da motilidade podem ser detectadas (VYT et al.,

2004) e categorizadas como é possível observar na Tabela 1. Portanto, além de motilidade total, motilidade progressiva, rápida, lenta, circular e local, os parâmetros da cinética celular também podem ser analisados (VERSTEGEN et al., 2002).

Tabela 1. Parâmetros de cinética celular medidas pelo sistema CASA

Parâmetro	Medida	Descrição
DCL	$\mu\text{m}$	Distância percorrida do trajeto real
DSL	$\mu\text{m}$	Distância percorrida do trajeto em linha reta
DAP	$\mu\text{m}$	Distância percorrida do trajeto médio
VCL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade percorrida do trajeto real
VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade percorrida do trajeto em linha reta
VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidade percorrida do trajeto médio
ALH	$\mu\text{m}$	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AOC	$^{\circ}$	Desvio médio de orientação da cabeça no trajeto curvilíneo
BCF	Hz	Frequência com que o trajeto curvilíneo cruza o trajeto médio
LIN	%	Linearidade: relação entre VSL/VCL
STR	%	Retilinearidade: relação entre VSL/VAP
WOB	%	Wobble: relação entre VAP/VCL, oscilação do trajeto curvilíneo em relação ao trajeto médio

Apesar destes parâmetros de motilidade serem bem definidos, é difícil determinar a influência que cada um deles exerce no processo de fecundação (DIDION, 2008). Segundo Broekhuijse et al. (2012) as características seminais avaliadas pelo sistema CASA explicam somente 5,9% do número de nascidos totais e 5,2% da variação na taxa de parto. Assim sendo, é importante salientar que um único teste dificilmente será suficiente para prever o potencial reprodutivo de um reprodutor, já que as avaliações são realizadas apenas com uma amostra representativa de todo ejaculado (FOX-CROFT et al., 2010).

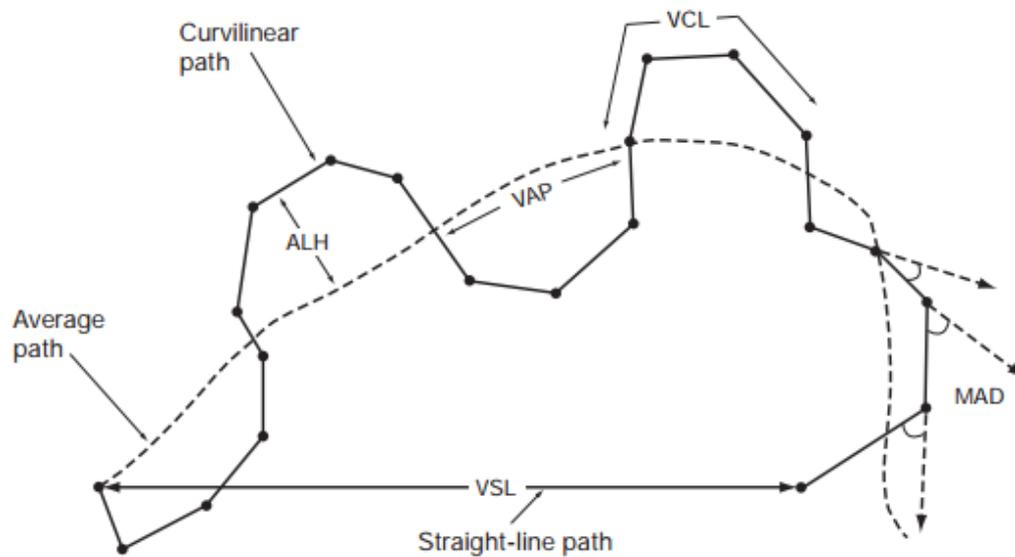


Figura 1 - Parâmetros de avaliação de motilidade espermática

*Average path* = trajeto médio, *Curvilinear path* = trajeto curvilíneo, *Straight line path* = trajeto retilíneo.

Fonte: WHO [2010]

## 2.3 Fatores que influenciam a avaliação espermática computadorizada

### 2.3.1 Concentração espermática

O sêmen *in natura* deve ser diluído antes da análise em função de que a alta concentração do ejaculado é prejudicial para a análise individual de cada célula (VERSTEGEN et al., 2002). Adicionalmente, em altas concentrações, uma grande parte dos espermatozoides de maior velocidade é excluída da análise devido a colisões ou aos efeitos das células vizinhas (IGUER-OUADA et al., 2001). Para a realização da diluição, os produtos utilizados não podem conter partículas de tamanho similar à cabeça dos espermatozoides, pois eles não serão diferenciados de espermatozoides imóveis. A contagem de um número maior de espermatozoides de uma amostra geralmente é em grande parte dependente da concentração (VERSTEGEN et al., 2002).

### 2.3.2 Temperatura

Após a ejaculação, os espermatozoides de machos suínos são sensíveis a reduções bruscas de temperatura. Alguns dados demonstram que a fluidez de membrana da cabeça e da cauda de espermatozoides é alterada em temperaturas de 31°C e 23°C (CANVIN et al., 1989).

Por influenciar a motilidade espermática, muitos estudos realizados em diferentes espécies tem tentado determinar a melhor temperatura para a realização das análises de doses inseminantes. Esta temperatura fica em torno de 38°C e é geralmente a escolhida para estudos em animais (VERSTEGEN et al., 2002).

### 2.3.3 Tempo de incubação

O período de incubação antes de o sêmen ser analisado varia consideravelmente entre estudos: um minuto (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001) em sêmen de cães, 10 minutos (HOLT et al., 1997) a 30 minutos no sêmen suíno (VYT et al., 2004) e 20 minutos em humanos (LARSEN et al., 2000). Vyt et al (2004) relataram uma diferença no tempo de espera antes das análises iniciarem a 37°C de 10 a 30 minutos em estudos de análise de doses de sêmen suíno. Visto que a análise da amostra seminal é preferível quando as células já estão completamente ambientadas, a influência das condições de incubação e a influência da condutividade térmica devem ser levadas em conta (VYT et al., 2008).

Segundo Verstegen et al (2002) quando a motilidade é observada a 37°C depois de um período de conservação a 17°C, movimentos circulares vigorosos são inicialmente observados. Entretanto, estes evoluem para um movimento mais suave e linear depois de 5 a 10 minutos de incubação. Estas observações indicam que submeter os espermatozoides a um período de incubação a 37°C depois de um período de armazenamento a 17°C influencia nos parâmetros de motilidade espermática (VYT et al., 2008).

Levando-se em conta que a análise de uma amostra de dose é preferível quando as células estão totalmente aclimatizadas, deve-se considerar além do tempo de incubação, a influência das condições de incubação e a influência da condutividade térmica e o diâmetro do recipiente utilizado, já que estes fatores influenciam a temperatura da alíquota de sêmen e, por conseguinte, espera-se que as características de movimento também sejam alteradas (VYT et al., 2008).

## 2.4 Diluição do sêmen para a produção de doses inseminantes

Espermatozoides *in natura* são diluídos juntamente com o plasma seminal provindo das glândulas acessórias durante a ejaculação e sua motilidade é mantida por algumas horas. Para aumentar a vida útil dos espermatozoides *in vitro*, é necessário que a atividade metabólica seja diminuída, tanto por substâncias inibidoras quanto por temperatura inferior à fisiológica (JOHNSON et al., 2000).

Devido a suas particularidades, os espermatozoides de suínos são extremamente sensíveis ao choque térmico (PURSEL et al., 1973), influenciando a viabilidade espermática. Especificamente, esta sensibilidade parece ser relacionada ao conteúdo lipídico da membrana celular espermática. Então quando a temperatura decresce, os movimentos laterais da membrana fosfolipídica são reduzidos e isso ocasiona a separação das fases lipídicas, resultando em alterações irreversíveis nas proteínas de membrana. Ao fim, a função da membrana espermática é alterada, comprometendo a viabilidade celular (WHITE, 1993). Esta reação ao choque térmico significa, na prática, que as doses devem ser mantidas entre 15 e 18°C, já que uma temperatura inferior limita sua viabilidade (PAULANEZ et al., 2000). A necessidade de preservar o sêmen a uma temperatura moderadamente baixa restringe a capacidade de armazenamento já que o metabolismo celular não pode ser reduzido de maneira eficiente e porque as condições microbiológicas podem não ser controladas efetivamente se comparado a temperaturas inferiores (5°C) (GADEA, 2003).

O diluente é definido como uma solução aquosa que permite um aumento no volume do ejaculado até o volume necessário para a produção das doses inseminantes, da mesma forma que preserva a função espermática e mantém a fertilidade satisfatória (GADEA, 2003). O seu uso, portanto, tem como principal objetivo prolongar a sobrevivência espermática, promover energia às células, agir como um tampão impedindo alterações bruscas no pH e não permitir que bactérias se proliferem (VYT et al., 2004). Desta forma, os diluentes para o uso em suínos contêm íons para manter a pressão osmótica, glicose como fonte de energia, tampões para estabilizar o pH, EDTA, devido à sua capacidade quelante que bloqueia a ação do cálcio como um mediador da capacitação espermática e reação de acrossoma (GADEA, 2003), além de antibióticos (JOHNSON et al., 2000).

Dependendo da composição do diluente, o sêmen pode ser armazenado por 2 a 3 dias em diluentes de curta duração e até 5 dias ou mais em diluentes de longa duração (JOHNSON et al., 2000). Os diluentes de longa duração diferem dos de curta duração principalmente pelo uso de complexos sistemas tampão e na maioria dos casos em adição ao tampão bicarbonato (JOHNSON et al., 2000). Dentre as vantagens de diluentes de longa duração pode-se ressaltar a possibilidade de transporte a longas distâncias, condução de testes diagnósticos antes da aplicação das doses e eficiência organizacional em CPS (GADEA, 2003).

Atualmente um dos diluentes mais utilizados na suinocultura é o Beltsville Thawing Solution (BTS). Desenvolvido por Pursel e Johnson (1975) para o descongelamento de sêmen, foi posteriormente adaptado para o armazenamento de doses resfriadas. Esse diluente

contém uma baixa concentração de potássio, responsável por manter a concentração intracelular deste íon a níveis fisiológicos durante o armazenamento.

## **2.5 Efeito do armazenamento na motilidade espermática**

Mudanças estruturais e funcionais que ocorrem no armazenamento de doses resfriadas se assemelham às mudanças ocorridas no sêmen *in natura* e podem ser determinadas pelas condições e tempo no qual este sêmen está sendo armazenado. O envelhecimento dos espermatozoides ocorre durante o armazenamento *in vitro* e depois da inseminação *in vivo* quando uma população de espermatozoides viáveis aguarda ser liberada em direção ao local da fecundação. Isso significa que o sucesso da fertilização depende de dois períodos referentes ao envelhecimento do espermatozoide: o período de armazenamento *in vitro* de até cinco dias e o período *in vivo*, que aumenta quando o intervalo entre a inseminação e a ovulação é superior a 12-24h (WABERSKI et al., 1994).

Em um ponto de vista prático, uma queda no potencial fertilizante durante o período de armazenamento não pode ser evitado, mesmo quando o termo “diluyente de longa duração” é utilizado. Alto número de espermatozoides, presença de plasma seminal e baixa taxa de diluição são fatores que parecem afetar a fertilidade ao longo do armazenamento (WEITZE, 1990). Experimentos *in vitro* demonstraram diferenças na viabilidade celular em diluentes de curta e longa duração durante 9 dias de armazenamento (DE AMBROGI et al., 2006). A motilidade, no entanto, permaneceu inalterada nas primeiras 72 horas, até mesmo no BTS. Diferenças entre os dois tipos de diluentes puderam ser vistas a partir do quarto dia de armazenamento em estudo realizado por Kuster e Althouse (1999). A redução da motilidade que ocorre durante o armazenamento por muito tempo tem sido o parâmetro mais utilizado para estabelecer a queda no potencial fertilizante. A perda de ATP e cAMP, assim como a absorção de cálcio reduzida, são fatores que estão relacionados com a queda de motilidade. Um importante indicador referente ao armazenamento é a mudança na permeabilidade de membrana e perda de substâncias intracelulares (JOHNSON et al., 2000).

Desta forma, a motilidade dos espermatozoides é um indicador de metabolismo inalterado e a estimativa do percentual de membranas viáveis é de fundamental importância no controle de qualidade diária do sêmen. Aferições regulares da motilidade após a diluição e durante o período de armazenamento fornecem informações relativas à capacidade de conservação do sêmen. Portanto, as doses armazenadas devem ser examinadas diariamente, com valores de motilidade acima de 60% para serem consideradas satisfatórias (JOHNSON et al., 2000).

### **3. ARTIGO: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO A 37°C DE DOSES DE SÊMEN RESFRIADAS E DILUÍDAS EM DOIS DIFERENTES DILUENTES NA ANÁLISE DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA NO SISTEMA CASA**

#### **3.1 Introdução**

Com a expansão da utilização da inseminação artificial (IA) em suínos, o controle de qualidade na produção de doses inseminantes vem se tornando cada vez mais importante (DEJARNETTE, 2012). Atualmente, mais de 90% da IA na produção de suínos ao redor do mundo é realizada com o uso de diluentes que garantem um período viável das doses por até 5 dias de armazenamento a uma temperatura de 15 a 18°C (JOHNSON et al., 2000). Para que as doses utilizadas sejam de qualidade, a avaliação da motilidade é essencial no exame do ejaculado e após o processamento das doses, podendo auxiliar no estabelecimento de correlações entre qualidade espermática e fertilidade (BROEKHUIJSE et al., 2011).

O sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) permite uma avaliação objetiva de diferentes características espermáticas como motilidade, velocidade, morfologia e concentração (VERSTEGEN et al., 2002). Juntamente com dados referentes à fertilidade a campo, o sistema tem impulsionado estudos que visam uma estimativa mais segura do potencial reprodutivo do macho suíno (BROEKHUIJSE et al., 2011). Entretanto, atualmente poucas informações estão disponíveis em relação às diferentes variáveis que podem afetar o processamento e avaliação do sêmen e suas consequências na qualidade das doses. Dentre estes fatores é possível citar o tempo de incubação a 37°C (tempo necessário para que os espermatozoides recuperem a motilidade) prévio às análises realizadas no sistema CASA.

O presente estudo, portanto, visa avaliar a influência do tempo de incubação a 37°C na motilidade espermática de doses de sêmen de suínos 24 e 72 horas após sua produção, comparando diluentes de curta e longa duração. Desta forma, uma técnica padrão poderá ser estabelecida para o sistema CASA, garantindo que estudos comparativos entre diferentes laboratórios possam ser realizados.

#### **3.2 Materiais e Métodos**

O presente estudo foi realizado na Granja Experimental e no Laboratório de Reprodução do Setor de Suínos localizado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre os meses de outubro e novembro de 2015. O sêmen foi obtido a partir de quatro ejaculados de cinco machos adultos e sexualmente maduros (n=20).

A coleta de sêmen foi realizada por um único coletador através da técnica da mão enluvada em um recipiente térmico previamente aquecido a 37°C, com filtro descartável para remoção da fração gelatinosa. No Laboratório os ejaculados foram imediatamente avaliados por um único técnico em relação às características macro (cor, odor e aspecto) e microscópicas. As análises de motilidade e concentração foram feitas através do sistema CASA (AndroVision<sup>®</sup>, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) em câmaras de contagem de 20 µm de profundidade (Leja<sup>®</sup>, Nieuw-Vennep, Holanda). Apenas ejaculados com mínimo de 70% de motilidade e até 20% de células com defeitos espermáticos foram aprovados para a produção de doses.

Todos os ejaculados foram divididos em *split sample* para produção de doses inseminantes em diluente de curta (BTS, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) e longa duração (Androstar Plus<sup>®</sup>, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) e posteriormente envasadas em bisnagas plásticas em um volume de 80 mL, contendo aproximadamente 3 bilhões de espermatozoides. Antes de serem armazenadas na conservadora, as doses permaneceram durante 90 minutos na temperatura ambiente da sala de processamento, a qual era mantida entre 20 e 22°C, para estabilização.

Em todos os tratamentos, as doses de sêmen foram mantidas sob resfriamento (17,3±0,5°C) por um período total de 72 horas. Durante esse período, as doses foram submetidas à agitação leve, uma vez ao dia, para a ressuspensão das células espermáticas. A análise de motilidade foi realizada 24 e 72 horas após a produção da dose. Para cada momento, uma dose de cada diluente era utilizada e após seu uso, descartada. Dessa forma, cada bisnaga foi aberta somente no momento anterior à sua avaliação.

Para as análises de motilidade das doses, de acordo com o tempo de incubação, uma alíquota de 1 mL da dose foi incubada em microtubos de 2 mL a 37°C, por 10, 20 e 30 minutos. A câmara foi preenchida por capilaridade com 3 µL de sêmen diluído. As amostras foram avaliadas ao microscópio óptico com aumento de 200x e contraste de fase negativo, imediatamente após o preenchimento. Todos os materiais que entraram em contato com as células espermáticas também estavam previamente aquecidos a 37°C.

O sistema CASA foi utilizado para a avaliação das características de motilidade espermática (total, progressiva, rápida, lenta, circular, local) e demais parâmetros de cinética espermáticas: ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio; BCF - frequência com que o traçado real cruza o traçado médio; DAP - distância percorrida do traçado médio; DCL - distância percorrida real; DSL - distância percorrida em linha reta; VAP - velocidade do trajeto médio; VCL - velocidade em linha curvilínea; VSL -

velocidade em linha reta; linearidade (VSL/VCL); STR (Retilinearidade) - VSL/VAP; WOB (Wobble) - VAP/VCL. Foram considerados imóveis, os espermatozoides com ALH inferior a 1  $\mu\text{m}$  e VCL inferior a 24  $\mu\text{m/s}$ . Para motilidade local, foi considerado o valor de VCL inferior a 48  $\mu\text{m/s}$  e o VSL inferior a 10  $\mu\text{m/s}$ . Os espermatozoides com raio superior a  $10^\circ$  e inferior a  $30^\circ$ , foram considerados com motilidade circular. Quando o raio foi superior a  $0,7^\circ$ , considerou-se o movimento de Rotação. Para um movimento ser classificado como motilidade lenta, o VCL foi inferior a 80  $\mu\text{m/s}$ , enquanto valores iguais ou maiores que 80  $\mu\text{m/s}$  se encaixaram na categoria de motilidade rápida.

### 3.3 Análise estatística

Os dados obtidos das doses de sêmen foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS (SAS, versão 9.4). As variáveis foram analisadas como medidas repetidas, em modelo com efeitos fixos do tempo de incubação (10, 20 e 30 minutos), do diluente (curta e longa duração), da idade das doses (24 e 72 horas) e de suas interações, além do efeito aleatório dos machos doadores do sêmen e da semana de avaliação. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.4 Resultados e Discussão

O sistema CASA tem sido desenvolvido há décadas tendo como o principal objetivo obter informações apuradas e precisas em relação à cinética dos espermatozoides individualmente (AMANN; KATZ, 2004). Embora a tecnologia do sistema seja bem desenvolvida, grandes variações em relação aos dados obtidos têm sido observadas. Estes dados demonstram a importância da padronização dos procedimentos realizados (EHLERS et al., 2011). O foco do presente trabalho se concentra na motilidade espermática de amostras seminais, já que esta característica é um indicativo de integridade de membranas, metabolismo ativo e é de grande importância para a capacidade de fertilização (JOHNSON et al., 2000).

A Tabela 1 mostra o efeito de todos os fatores analisados (diluente, tempo de incubação e idade das doses) e suas interações nos parâmetros analisados. No presente estudo, o diluente de longa duração teve um desempenho superior ao de curta duração para as características de motilidade espermática, com exceção da variável rotação e STR que não foram influenciadas pelo diluente. Da mesma forma, em estudos prévios, ejaculados diluídos em sêmen de curta duração (BTS) apresentaram motilidade inferior aos espermatozoides diluídos em diluentes de longa duração (HUO et al., 2002; KOMMISRUUD et al., 2002; DUBÉ

et al., 2004). O melhor desempenho do diluente de longa ação na manutenção prolongada da qualidade espermática pode ser explicado pelo fato de que a função do diluente é permitir que o espermatozoide se mantenha viável durante um período superior (JOHNSON et al., 2000), devido aos componentes adicionais, que asseguram melhor controle de pH e proteção de membranas (DE AMBROGI et al., 2006).

Em nosso estudo a motilidade foi dependente do tempo transcorrido após a produção das doses. De uma maneira geral as amostras avaliadas nas 24h apresentaram resultados superiores àquelas avaliadas em 72h após a diluição final. Ou seja, até a hora 24 as motilidades se mantiveram elevadas para ambos os diluentes. Similarmente, doses com 72h apresentaram um decréscimo nos parâmetros de deslocamento e velocidade espermática em ambos os diluentes. Estes resultados eram esperados, já que o efeito do período de armazenamento das doses reflete em envelhecimento celular. Em um ponto de vista prático, uma queda no potencial fertilizante durante o período de armazenagem não pode ser evitado, mesmo quando um diluente de longa duração é utilizado, pois alterações funcionais e estruturais ocorrem nos espermatozoides mesmo com a ação do diluente. Estas alterações reduzem a capacidade de fecundação dos espermatozoides e afetam a qualidade da dose espermática (WABERSKI, 1994).

O período de incubação antes de o sêmen ser analisado varia consideravelmente entre estudos: de 10 minutos (HOLT et al., 1997) a 30 minutos (VYT et al., 2004). Visto que a análise da amostra seminal é preferível quando as células já estão completamente ambientadas, a influência das condições de incubação e a influência da condutividade térmica devem ser levadas em conta (VYT et al., 2008). Em nosso estudo, não houve diferença estatística em relação à motilidade total e motilidade progressiva, no que se diz respeito ao tempo de incubação das amostras (Tabela 1). Entretanto, quando estratificamos a motilidade progressiva em motilidade rápida, motilidade lenta e motilidade circular foram observados os efeitos do tempo de incubação, como pode ser visto na Tabela 1. As variáveis VCL, VAP, DCL, DAP e motilidade rápida apresentaram resultados superiores no tempo de incubação 10 minutos, se comparados aos tempos 20 e 30 minutos, como pode ser verificado na Figura 1 (Gráficos A, B e E).

Estudos recentes buscam identificar parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA e relacionar com a fertilidade de reprodutores *in vivo*. O estudo de Broekhuijse et al. (2012) revelou um efeito positivo significativo na taxa de parto em relação à variável motilidade progressiva, o qual não apresentou diferença em nosso estudo, e um efeito negativo do VCL, o qual representa a velocidade percorrida do trajeto real. Por outro lado, o

número de leitões nascidos totais foi afetado positivamente pelo percentual da motilidade total e VSL, os quais não apresentaram diferença entre os tratamentos no presente experimento. Por outro lado, em estudo realizado por Holt et al. (1997) foi possível constatar que amostras com elevado VSL foram associadas com leitegadas maiores. Além destes parâmetros o número de nascidos totais foi influenciado positivamente pelo VAP, definido como velocidade percorrida do trajeto médio (BROEKUIJSE et al., 2012).

As variáveis BCF, WOB, motilidade lenta e motilidade circular apresentaram valores inferiores no momento 10 minutos, Figura 1 (C e D). A variável BCF, que estima a frequência com que o trajeto curvilíneo cruza o trajeto médio, é útil para a identificação de mudanças no padrão de batimento da cauda dos espermatozoides (SELLES et al., 2003). Em estudo realizado por Broekhuijse et al. (2012) foi possível evidenciar uma relação negativa entre BCF e taxa de parto. Este resultado indica que no momento da análise é preferível que o valor de BCF esteja baixo, como um indicativo de que o espermatozoide ainda não está realizando movimentos de cauda de modo a poupar a energia até o momento da penetração na zona pelúcida (GIL et al., 2009).

Houve interação entre o tempo de incubação e a idade da dose em relação às variáveis motilidade lenta, motilidade circular, LIN e STR, vide Figura 2 (A, B, C e D) e Tabela 1. A motilidade lenta apresentou maiores valores na hora 72 de análise, na qual o tempo de incubação 20 minutos se sobressaiu sobre os demais. Na análise com doses de 24 horas, o maior valor foi encontrado aos 30 minutos de incubação. A motilidade circular teve melhor desempenho na análise às 24 horas. Adicionalmente os maiores valores foram encontrados no tempo de incubação de 10 minutos. A variável STR, definida como relação entre VSL/VAP e LIN, relação entre VSL/VCL, foram superiores nas 24 horas e alcançaram seus valores máximos nos 30 minutos de incubação. Em relação à linearidade, Holt et al. (1997) observaram que amostras com elevado LIN foram associadas com leitegadas maiores. É importante salientar, entretanto, que apesar dos estudos citados acima terem encontrado relação entre as variáveis disponibilizadas pelo sistema CASA, outros estudos não têm encontrado associação entre parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA e a fertilidade de machos suínos (DIDION, 2008).

Para as variáveis motilidade progressiva, motilidade rápida, motilidade local, motilidade lenta, DSL, DAP, VSL, raio, STR, LIN e WOB houve efeito da interação entre diluente e idade das doses, conforme a Tabela 1 e Figuras 3 e 4. Para as variáveis motilidade rápida e progressiva, o diluente de longa duração foi superior nas 24h e 72h, Figura 3 (A e B). Entretanto, para as variáveis motilidade local e lenta o diluente de curta duração obteve

maiores valores nas duas medições, 24 e 72h, Figura 3 (C e D). Em relação aos parâmetros de motilidade, o diluente de longa duração foi superior nas duas medições para as variáveis DSL, DAP, VSL, raio e WOB, Figura 4 (A, B, C, D e G, respectivamente). Para a variável STR, Figura 4 (E), o diluente de curta duração teve maiores valores nas 24h, entretanto nas 72h não foi constatada diferença entre os diluentes e idade das doses. A variável LIN, Figura 4 (F), apresentou diferença estatística apenas nas 72h, na qual o diluente de longa duração foi superior. Observou-se, portanto, que o diluente de longa ação já apresenta superioridade na preservação das características cinéticas dos espermatozoides mesmo em um momento curto de armazenamento.

Estudos têm sido realizados a fim de comparar a fertilidade dos machos com parâmetros de motilidade e cinética espermática, utilizando o sistema computadorizado. Além disso, diversos estudos utilizam os parâmetros utilizados no presente estudo para avaliar o comportamento das doses em diferentes diluentes ou o até mesmo o uso de aditivos nas doses de sêmen. Na rotina de CPS, a avaliação de doses ao longo do armazenamento é uma prática comum e recomendada para avaliar a viabilidade das doses que estão sendo usadas a campo. Todavia, poucos são os cuidados observados nesta monitoria de qualidade. É importante, portanto, que estas avaliações sejam padronizadas com relação ao preparo da amostra, para que os resultados sejam confiáveis e comparáveis. O estudo realizado mostrou que o tempo que as doses permanecem incubadas a 37°C para recuperar as características de motilidade espermática influencia os resultados, tanto no diluente de curta ou longa duração e também em doses em diferentes idades após o processamento.

### **3.5 Conclusão**

É evidente que a diminuição da motilidade espermática ocorre com o maior tempo de armazenamento das doses em virtude do envelhecimento celular. A superioridade do diluente de longa duração pode ser constatada em ambos os momentos de avaliação, demonstrando que seu efeito protetor é também superior em intervalos menores de armazenamento. Apesar do tempo de incubação não afetar os principais parâmetros de motilidade medidos pelo sistema CASA, motilidade total e motilidade progressiva, as demais variáveis foram afetadas negativamente com o transcorrer do tempo de incubação. Portanto, ao compilar as informações obtidas, é possível concluir que o período ideal para incubação a 37°C é ao redor de 10 minutos. Contudo, faz-se necessária a realização de trabalhos que estudem intervalos de tempos intermediários, que sejam aplicados à rotina dos laboratórios comerciais e também para a execução de trabalhos de pesquisa.

Tabela 1 - Efeito (valor de P) do diluente, tempo de incubação, idade das doses, interação entre tratamento e idade das doses e interação entre idade das doses e diluente em relação às características de motilidade de doses inseminantes.

	Diluente (D)	Tempo de incubação (TI)	Idade das doses (ID)	TI x ID	D x ID	D x TI	D x TI x ID
Mot. Total, %	<,0001	0,0879	<,0001	0,3802	0,1942	0,4637	0,8636
Mot. Progressiva, %	<,0001	0,1416	<,0001	0,1870	<,0001	0,5091	0,8676
Mot. Rápida, %	<,0001	<,0001	<,0001	0,5230	<,0001	0,5274	0,8644
Mot. Lenta, %	<,0001	<,0001	<,0001	0,0081	<,0001	0,8260	0,7801
Mot. Circular, %	<,0001	0,0005	<,0001	0,0003	0,7531	0,6258	0,8060
Mot. Local, %	<,0001	0,6814	0,0003	0,1254	0,0003	0,3920	0,8170
DCL, $\mu\text{m}$	<,0001	<,0001	<,0001	0,3183	0,0864	0,7031	0,7057
DSL, $\mu\text{m}$	<,0001	0,2626	<,0001	0,8210	0,0101	0,8231	0,7170
DAP, $\mu\text{m}$	<,0001	0,0006	<,0001	0,3500	0,0394	0,9327	0,7148
VCL, $\mu\text{m/s}$	<,0001	<,0001	<,0001	0,2803	0,1697	0,5405	0,7945
VSL, $\mu\text{m/s}$	<,0001	0,3455	<,0001	0,8301	0,0372	0,9869	0,7955
VAP, $\mu\text{m/s}$	<,0001	0,0005	<,0001	0,4887	0,1391	0,6497	0,7072
Raio, $^{\circ}$	<,0001	0,1275	<,0001	0,6885	0,0370	0,9184	0,6399
Rotação, $^{\circ}$	0,1423	0,0973	0,0005	0,2857	0,1334	0,3604	0,4477
BCF, Hz	<,0001	0,0228	<,0001	0,5999	0,3037	0,9633	0,8088
STR, %	0,6286	<,0001	<,0001	0,0153	0,0149	0,5838	0,9817
LIN, %	0,0460	<,0001	0,0009	0,0384	0,0109	0,6989	0,9766
WOB, %	<,0001	<,0001	<,0001	0,1782	0,0274	0,9267	0,7639

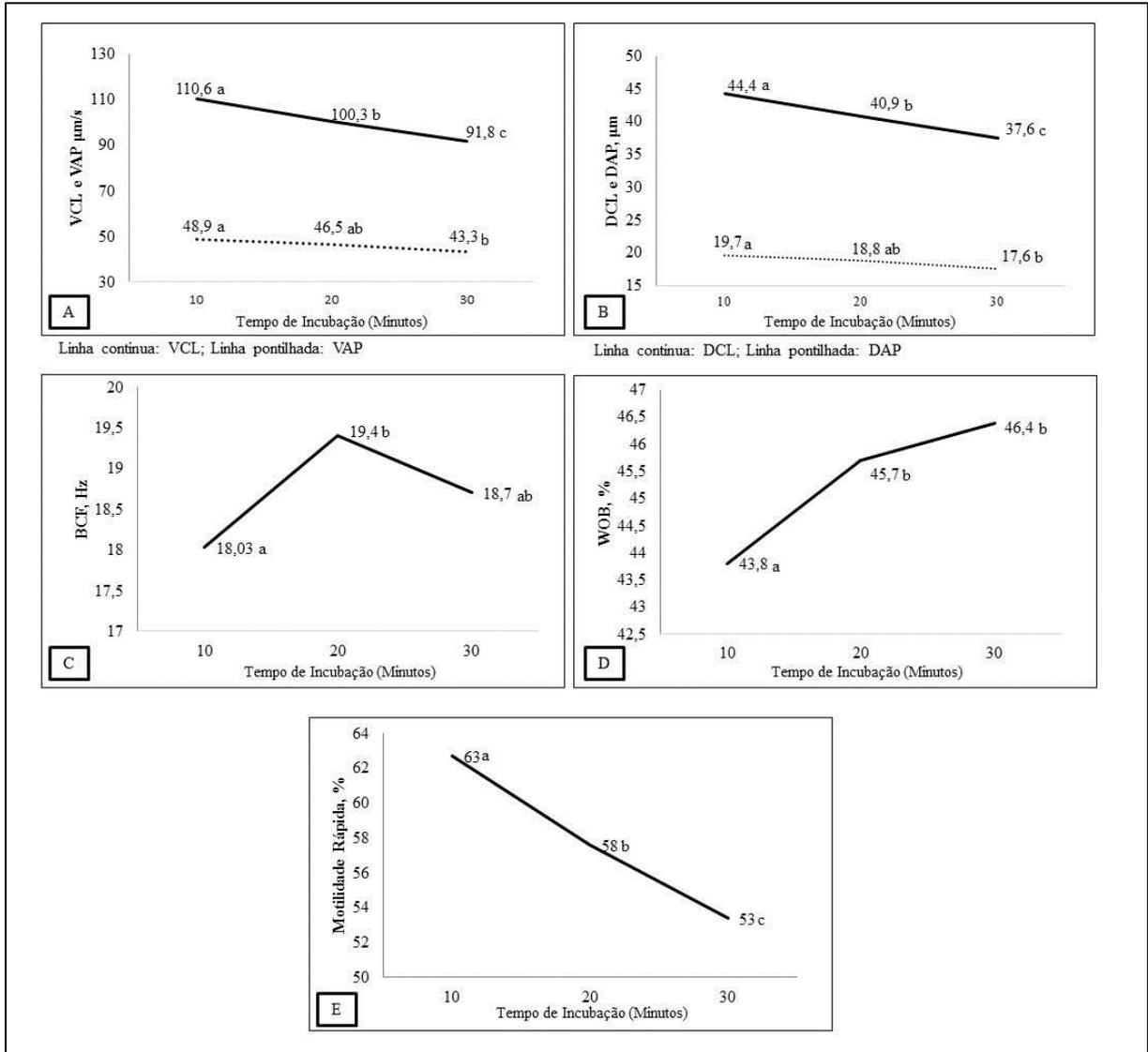


Figura 1: Efeito do tempo de incubação após a diluição final, para as variáveis VCL e VAP (A), DCL e DAP (B), BCF (C), WOB (D) e motilidade rápida (E). Letras diferem ( $P < 0,05$ ) entre o tempo de incubação.

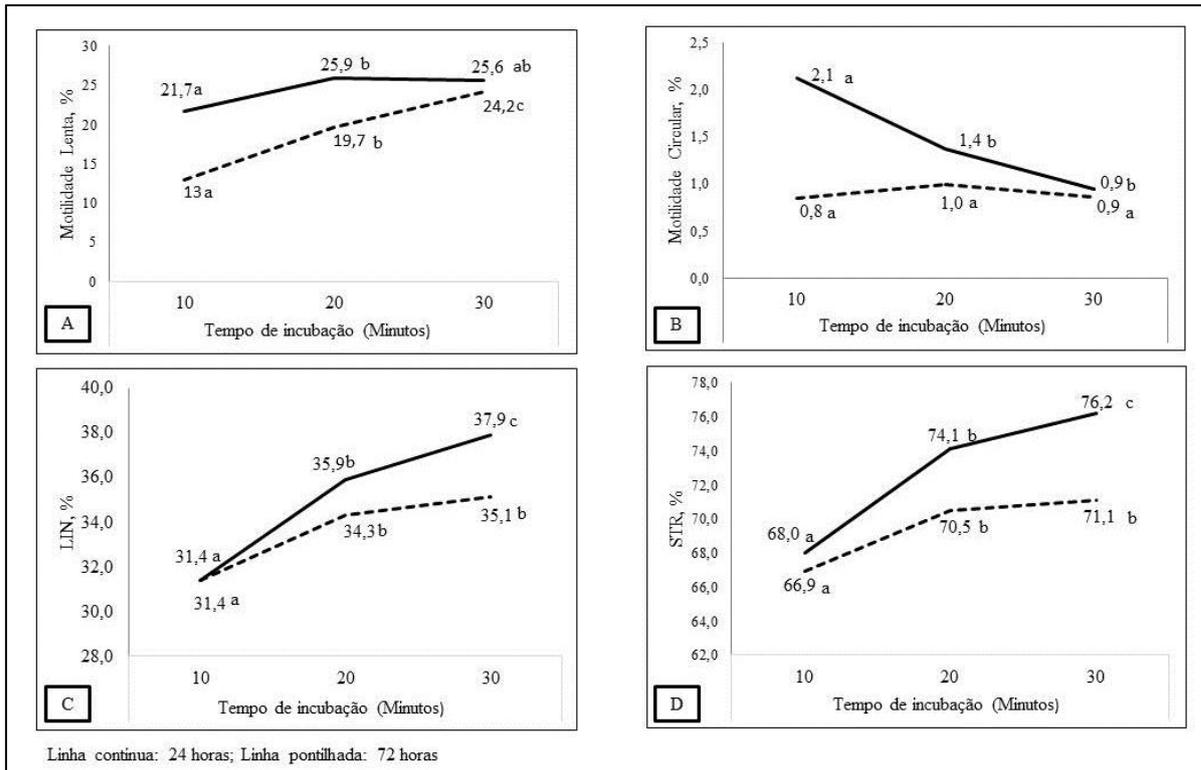


Figura 2: Efeito da interação entre tempo de incubação e idade das doses após a diluição final, para as variáveis motilidade lenta (A), motilidade circular (B), LIN (C), STR (D). Letras diferem ( $P < 0,05$ ) entre o tempo de incubação dentro de cada idade das doses.

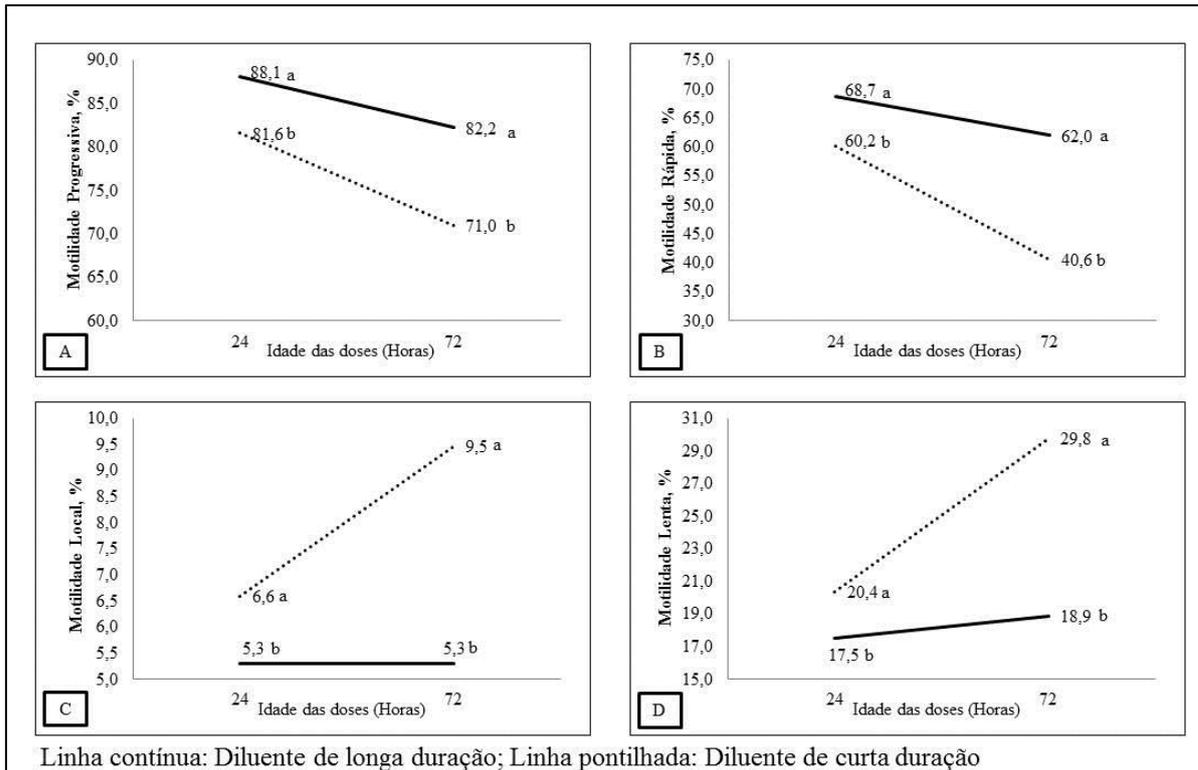


Figura 3: Efeito da interação entre dilúente e idade das doses após a diluição final, para as variáveis motilidade progressiva (A), motilidade rápida (B), motilidade local (C) e motilidade lenta (D). Letras diferem ( $P < 0,05$ ) entre diluentes em cada idade das doses.

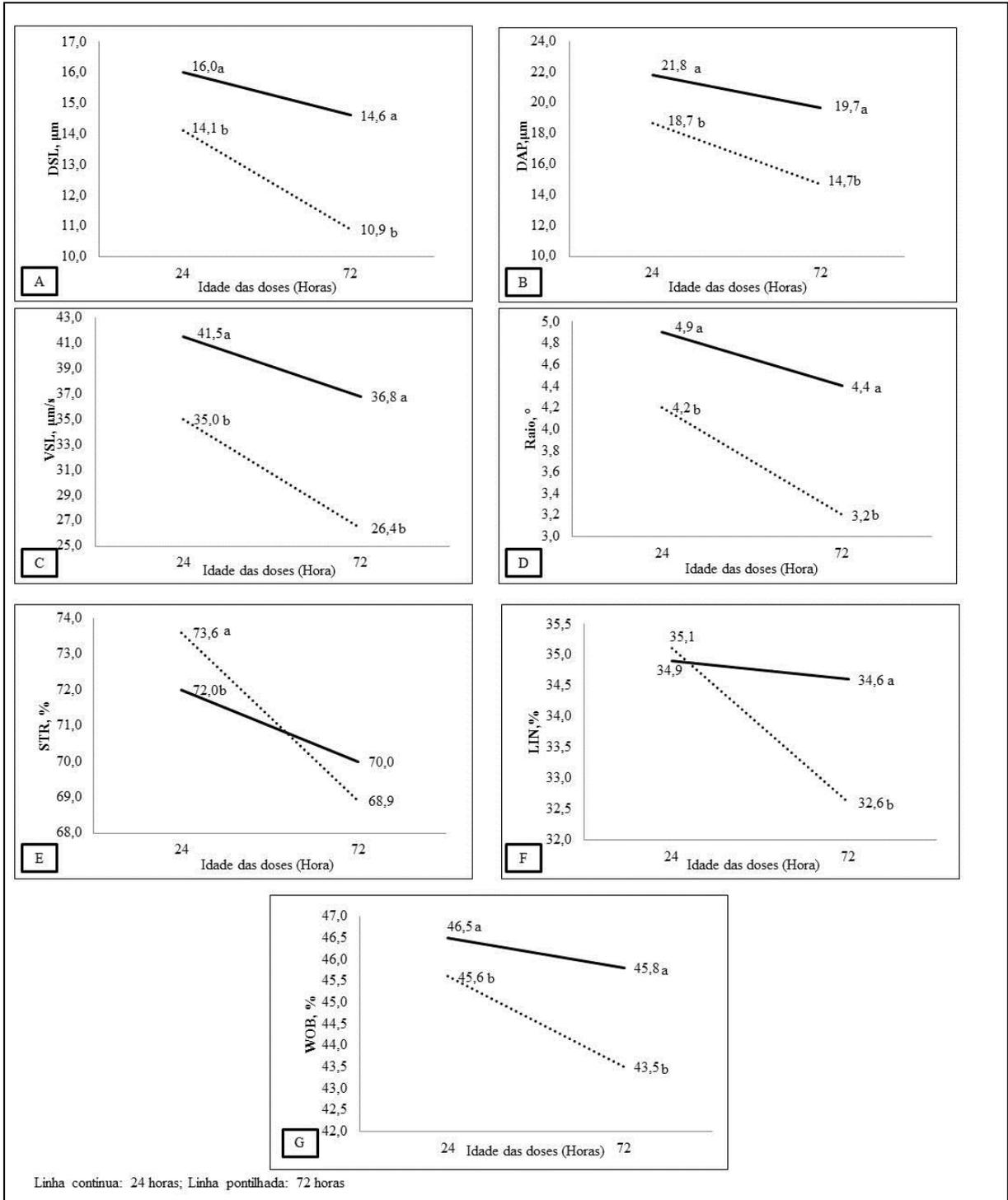


Figura 4: Efeito da interação entre diluente e idade das doses após a diluição final, para as variáveis DSL (A), DAP (B), VSL (C), raio (D), SRT (E), LIN (F) e WOB (G). Letras diferem ( $P < 0,05$ ) entre diluentes em cada idade das doses.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente que a diminuição da motilidade espermática ocorre com o maior tempo de armazenamento das doses em virtude do envelhecimento celular. A superioridade do diluente de longa duração (Androstar Plus<sup>®</sup>) pode ser constatada em ambos os momentos de avaliação, demonstrando que seu efeito protetor é também superior em intervalos menores de armazenamento. Apesar do tempo de incubação não afetar os principais parâmetros de motilidade medidos pelo sistema CASA, motilidade total e motilidade progressiva, as demais variáveis foram afetadas negativamente com o transcorrer do tempo de incubação. Portanto, ao compilar as informações obtidas, é possível concluir que o período ideal para incubação a 37°C é ao redor de 10 minutos, pois apesar de não serem totalmente entendidos, alguns fatores relacionados à cinética espermática tiveram desempenho inferior com o transcorrer do tempo prévio às análises.

É necessário levar em conta também que um tempo mínimo antes da análise iniciar deve ser respeitado já que, quando a motilidade é observada após um período de conservação a 17°C, movimentos circulares vigorosos são inicialmente observados. Entretanto, estes evoluem para um movimento mais suave e linear depois de 5 a 10 minutos de incubação, sendo considerados mais reais (VERSTEGEN et al., 2002). Além disso, a definição de um tempo de incubação ideal para as amostras visa padronizar os procedimentos de avaliação da motilidade das doses de sêmen armazenadas. Finalmente, mais estudos devem ser realizados para o completo entendimento dos fatores que levam a uma diminuição dos parâmetros de motilidade ao longo do tempo de incubação.

## 5. REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G. C.; YOUNGQUIST, R.; THRELFALL, W. Artificial insemination in swine: boar stud management. **Current therapy in large animal theriogenology**. St. Louis, MO: **Saunders Elsevier**, 2 ed. p. 731-738, 2007.

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

AMANN RP.; SWAN SH.; TOLLNER CR.; TREECE C.; DROBNIS EZ.; WANG C.; Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. **J Androl**, v. 25:645-56, 1989.

AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n.1, p. 5-17, 2014.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F. M.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L. Exame do ejaculado. *In*: BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. (Ed.). **Suinocultura em Ação - inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Palotti, v. 2 p. 69-90, 2005.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Application of computer assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of animal science**, v. 90, n. 3, p. 779-789, 2011.

CANVIN AT.; BUHR MM. Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. **J Reprod Fertil**, 85:533-40,1989.

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

DEJARNETTE JM. Semen quality control and quality assurance in AI centers. **Proceedings Association for Applied Animal Andrology Conference, Vancouver**, 7-18, 2012.

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

DUBE´, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C. & BAILEY, J. L. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, 62, 874-886, 2004.

EHLERS, J.; BEHR, M.; BOLLWEIN, H.; BEYERBACH, M.; WABERSKI, D. standardization of computer assisted semen analysis using an e-learning application. **Theriogenology**, 76:448-454, 2011.

FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of reproduction and fertility**, v. 52, p. 67-78, 1997.

FOXCROFT, G. R., PATTERSON, J., CAMERON, A., DYCK, M. K. Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. In: **Proceedings of the 21st IPVS CONGRESS**, Vancouver, Canada. p. 25-29, 2010.

GADEA, J. Spanish Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine **Journal of Agricultural Research**, vol. 1 (2), 17-27, 2003.

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

GIL, M. C.; GARCIA-HERREROS M.; BARON F. J.; APARICIO I. M.; SANTOS, A. J.; GARCIA-MARIN, L. J.. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. **Theriogenology** 71:254–263, 2009.

HOLT C.; W.V. HOLT, H.D.M.; MOORE, H.C.B.; REED, R.M.; CURNOCK. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials, **J Androl**, 18, 312-323,1997.

HUO, L.J.; M.A, X.H. & YANG, Z.M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during longterm storage. **Theriogenology** 58, 1349–1360, 2002.

IGUER-OUADA M, VERSTEGEN JP. Evaluation of the “Hamilton Thorne computer based automated system” for dog semen analysis. **Theriogenology**; 55:733-49, 2001.

JOHNSON LA.; WEITZE KF.; FISER P.; MAXWELL WM. Storage of boar semen. **Anim Reprod Sci**, 62:143–72, 2000.

KOMMISRUD, E.; PAULENZ, H.; SEHESTED, E. & GREVLE, I. S. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 43, 49–55, 2002.

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

LANGENDIJK, P.; BOUWMAN, E.G.; SCHAMS, D. Effects of different sexual stimuli on oxytocin release, uterine activity and receptive behaviour in estrous sows. **Theriogenology**, v.59, p.849-861, 2003.

LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T.K.; BONDE, J.P.; ERNST, E.; HJOLLUND, N.H.; ZHOU, Y.; SKAKKEBÆK, N.E.; GIWERCMAN, A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Hum Reprod**, 15, 1562–1567, 2000.

LENZI A. Computer-aided semen analysis (CASA) 10 years later: a test-bed for the European scientific andrological community. **Int J Androl**, 20:1-2, 1997.

PAULENZ H.; KOMMISRUD E.; HOFMO P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reprod Dom Anim** vol. 35, 83-85, 2000.

POPWELL JM, FLOWERS WL. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reprod Sci**, 81:97-113, 2004.

PURSEL V.G.; JOHNSON L.A.; SCHULMAN L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J Anim Sci**, v. 37, 528-531, 1973.

SELLES, E.; J. GADEA, R.; ROMAR, C.; MATAS. S. RUIZ. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. **Reprod. Domest. Anim.** 38:66–72, 2003.

TEJERINA, F.; BURANAAMNUAY, K.; SARAIVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology**, v. 69, p. 1129-1138, 2008.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

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

VYT, P.; MAES, D.; QUINTEN, C.; RIJSSELAERE, T.; DELEY, W.; AERTS, M.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. **Flemic Veterinary**, v. 77, p. 291-298, 2008.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; LIETMANN, C.; LU<sup>BBERT</sup> ZUR LAGE, W.; BORTOLOZZO, F.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology** 41, 1367–1377, 1994.

WEITZE K.F. Long-term storage of extended boar semen. **Reprod Dom Anim**, Suppl 1, 231-253, 2000.

WHITE I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod Fertil** vol.5, 639-658, 1993.

YEUNG, C. H.; COOPER, T. G.; NIESCHLAG, E. A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. **Fertility and sterility**, v. 67, p. 1156-1158, 1997.

## 6. ANEXO

	BTS						ANDROSTAR						Effect
	24h			72h			24h			72h			
	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	
MotTot	88,22±1,65	89,72±1,65	86,93±1,65	82,40±1,65	81,30±1,65	77,78±1,65	93,28±1,65	93,92±1,65	92,99±1,65	88,42±1,65	87,47±1,65	86,80±1,65	D, ID
MotProg	81,32±1,96	83,47±1,96	80,18±1,96	74,03±2,45	71,30±2,45	67,73±2,45	87,35±1,96	89,02±1,96	87,95±1,96	83,35±2,45	82,31±2,45	81,13±2,45	D, ID, IDxD
MotRap	65,44±2,8	61,53±2,8	53,54±2,8	46,67±2,8	38,70±2,8	36,57±2,8	73,04±2,8	68,88±2,8	64,35±2,8	65,70±2,8	61,18±2,8	59,29±2,8	D, ID, TI, IDxD
MotLent	14,21±1,56	20,90±1,56	26,15±1,56	26,80±1,56	31,93±1,56	30,79±1,56	11,75±1,56	18,43±1,56	22,21±1,56	16,51±1,56	19,80±1,56	20,50±1,56	D, ID, TI, IDxD IDxTI
MotCir	1,68±0,25	1,03±0,25	0,49±0,25	0,55±0,25	0,66±0,25	0,37±0,25	2,56±0,25	1,70±0,25	1,39±0,25	1,13±0,25	1,33±0,25	1,35±0,25	D, ID, TI, IDxTI
MotLoc	6,89±0,72	6,26±0,72	6,75±0,72	8,37±0,82	10,0±0,82	10,04±0,82	5,93±0,72	4,9±0,72	5,04±0,72	5,07±0,82	5,15±0,82	5,67±0,82	D, ID, IDxD
DCL	44,15±1,72	40,7±1,72	36,16±1,72	36,26±1,72	34,43±1,72	31,3±1,72	51,38±1,72	45,07±1,72	43,15±1,72	45,91±1,72	43,41±1,72	39,64±1,72	D, ID, TI
DSL	13,95±0,62	14,63±0,62	13,82±0,62	10,88±0,79	11,32±0,79	10,65±0,79	15,69±0,62	16,04±0,62	16,27±0,62	14,25±0,79	15,33±0,79	14,34±0,79	D, ID, IDxD
DAP	20,17±0,89	18,85±0,89	17,17±0,89	15,26±0,89	15,07±0,89	13,89±0,89	23,25±0,89	21,19±0,89	20,84±0,89	20,26±0,89	20,25±0,89	18,54±0,89	D, ID, TI, IDxD
VCL	108,5±4,61	98,36±4,61	87,9±4,61	86,63±4,61	81,83±4,61	74,5±4,61	131,9±4,61	113,9±4,61	107,8±4,61	115,4±4,61	107,3±4,61	97,08±4,61	D, ID, TI
VSL	35,09±1,64	35,93±1,64	34,03±1,64	26,31±1,98	27,24±1,98	25,59±1,98	41,82±1,64	41,39±1,64	41,34±1,64	36,53±1,98	38,31±1,98	35,52±1,98	D, ID, DxID
VAP	47,67±2,11	45,79±2,11	41,95±2,11	36,64±2,5	36,04±2,5	33,25±2,5	60,1±2,11	53,82±2,11	52,31±2,11	51,18±2,5	50,16±2,5	45,6±2,5	D, ID, TI
Raio	4,29±0,18	4,34±0,18	4,01±0,18	3,30±0,23	3,36±0,23	3,12±0,23	5,06±0,18	4,82±0,18	4,80±0,18	4,37±0,23	4,55±0,23	4,2±0,23	D, ID, IDxD
Rot	0,54±0,07	0,36±0,07	0,33±0,07	0,27±0,07	0,27±0,07	0,24±0,07	0,43±0,07	0,40±0,07	0,39±0,07	0,35±0,07	0,36±0,07	0,33±0,07	ID
BCF	17,93±0,77	19,73±0,77	18,98±0,77	15,38±0,77	16,38±0,77	15,63±0,77	20,4±0,77	21,67±0,77	21,76±0,77	18,44±0,77	19,79±0,77	18,72±0,77	D, ID, TI
STR	69,28±0,93	74,69±0,93	76,79±0,93	66,62±1,46	69,77±1,46	70,28±1,46	66,63±0,93	73,57±0,93	75,53±0,93	67,09±1,46	71,3±1,46	71,69±1,46	ID, TI, IDxD, DxTI
LIN	31,76±0,79	35,8±0,79	37,9±0,79	30,61±1,11	33,06±1,11	34,09±1,11	31,08±0,79	35,88±0,79	37,83±0,79	32,09±1,11	35,61±1,11	36,04±1,11	D, ID, TI, IDxD IDxTI
WOB	43,63±0,58	45,94±0,58	47,12±0,58	42,39±0,84	43,69±0,84	44,31±0,84	44,79±0,58	46,69±0,58	47,97±0,58	44,55±0,84	46,55±0,84	46,38±0,84	D, ID, TI, IDxD

ID= Idade da dose; TI= Tempo de incubação; D= Diluente, IDxD= Interação entre Idade da dose e Diluente; IDxTI= Interação entre Idade da dose e Tempo de incubação; DxID= Interação entre Diluente e Idade da dose