

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

**ALTERAÇÕES DE pH E DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO DURANTE O TESTE DE
TERMORRESISTÊNCIA**

Autor: Flávia Giovana da Silva Letsch

PORTO ALEGRE

2022/2

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

**ALTERAÇÕES DE PH E DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO DURANTE O TESTE DE
TERMORRESISTÊNCIA**

Autora: Flávia Giovana da Silva Letsch

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientadora: Ana Paula G. Mellagi

Coorientadora: Thaís Spohr Christ

PORTO ALEGRE

2022/2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família, pelo apoio incondicional e suporte durante todos esses anos de faculdade. Especialmente a minha mãe Sandra, que sempre acreditou em mim e nunca mediu esforços para que meu sonho seguisse se tornando realidade e ao meu pai Fernando, que mesmo tendo partido antes dessa jornada chegar ao fim, tenho certeza que segue tendo muito orgulho da pessoa que pude me tornar. Aos meus irmãos, Eduardo, Guilherme e Gustavo por sempre terem sido os melhores conselheiros nas horas de dúvida e incerteza.

Aos meus amigos da vida, que sempre torceram pelo meu sucesso e vibraram com as minhas conquistas, especialmente Fabiana e Nathan, que nunca soltaram minha mão e fizeram dessa caminhada um caminho mais leve a ser percorrido.

Aos amigos que a faculdade me trouxe e eu pude ter a oportunidade de vivenciar o crescimento deles também, especialmente Bruna, Eduarda e Taiane, que tive o orgulho de partilhar momentos inesquecíveis dentro da sala de aula e espero levar elas para toda a minha vida.

Aos professores do Setor de Suínos, por terem aberto as portas para mim e confiado no meu potencial, fornecendo suporte e incentivo para que eu pudesse evoluir, em especial ao Professor Fernando Bortolozzo, por proporcionar a oportunidade de realizar o meu intercâmbio.

À equipe do experimento pelo suporte necessário para a realização desse trabalho, em especial a Monike, que com todo o seu conhecimento dispôs do seu tempo para de ajudar com a escrita acadêmica. À minha orientadora, Professora Ana Paula Mellagi, pelo incentivo e confiança. À minha coorientadora Thaís, pelas incansáveis horas de ajuda e apoio para a confecção do trabalho final.

À UFRGS pelo ensino.

Flávia Giovana da Silva Letsch

ALTERAÇÕES DE PH E DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO DURANTE O TESTE DE
TERMORRESISTÊNCIA

Aprovado em 05 ABR 2023

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Gonçalves Mellagi
Orientador e Presidente da Comissão

MSc. Thaís Spohr Christ
Coorientadora

Prof. Dr. André Gustavo Cabrera Dalto
Membro da Banca

Prof. Dr. Fernando Caetano de Oliveira
Membro da Banca

RESUMO

A capacidade fecundante dos espermatozoides pode ser avaliada, em parte, pelo teste de termorresistência (TTR), por meio da submissão de uma alíquota da dose a um período de incubação pré-estabelecido, a temperatura de 38°C, no intuito de mimetizar as condições do trato reprodutivo da fêmea. No entanto, a escassez de estudos que avaliem as condições ao longo do TTR dificulta a elucidação das alterações sofridas pela dose inseminante logo após a inseminação até o momento da fusão com o oócito. Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar as oscilações de pH de doses inseminantes ao longo do TTR, a fim de correlacioná-las com alterações de motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e presença de aglutinações. Trinta e três ejaculados foram diluídos em Androstar Plus®, armazenados a 17°C e avaliados 48h após o envase (AntesTTR), após 30 min e 300 min de incubação a 38°C. No geral, houve decréscimo da motilidade total no momento 300 min ($P < 0,01$) e da motilidade progressiva no momento 30 min ($P < 0,01$). O pH das doses teve aumento ao longo do TTR ($P < 0,01$). Além disso, os machos foram classificados, de acordo com a motilidade progressiva AntesTTR em classe Baixa (motilidade progressiva $\leq 70\%$), Média ($>70\% - <80\%$) e Alta ($\geq 80\%$). Doses da classe Baixa apresentam menor motilidade total e progressiva em todos os momentos do TTR do que a classe Média e Alta ($P \leq 0,05$), além de maior queda de motilidade ao longo do TTR. Houve interação entre classe de machos e momento para o pH ($P = 0,03$), em que doses da classe Baixa apresentaram aumento de pH no momento 30min ($P < 0,05$), enquanto doses Média e Alta apresentaram aumento em 300min ($P < 0,05$). A integridade de membrana plasmática foi influenciada pelo momento do TTR e classe. Houve diminuição das células com membrana íntegra em 300min para todas as classes ($P = 0,03$). Machos da classe Baixa apresentaram menor integridade de membrana plasmática do que machos da classe Média e Alta ($P < 0,01$). A integridade de acrossoma sofreu influência do momento ($P = 0,04$), sem efeito de classe ou interação dos fatores. A gravidade das aglutinações aumentou após 300 min de TTR ($P < 0,05$) e foi maior na classe de Baixa ($P < 0,01$). Dessa forma, os resultados sugerem que o TTR tem um papel fundamental na diminuição da qualidade espermática e no aumento do pH; porém, com diferença entre classes de machos.

Palavras-chave: Acrossoma. Membrana Plasmática. Sêmen Suíno. Qualidade de Doses.

ABSTRACT

The fertilizing capacity of spermatozoa can be evaluated, at least in part, by the thermoresistance test (TRT), by submitting an aliquot of the sperm dose to a pre-established incubation period, at 38°C, to simulate the conditions of the female reproductive tract. However, limited studies evaluating the conditions during the TRT make it difficult to elucidate the alterations suffered by the semen dose right after insemination until the moment of fusion with the oocyte. Thus, the present study aimed to evaluate the pH oscillations of semen doses throughout the TRT, to correlate them with changes in motility, plasma membrane integrity, acrosome integrity, and the presence of agglutinations. Thirty-three ejaculates were diluted in Androstar Plus®, stored at 17°C, and evaluated 48h after filling (pre-TRT), after 30 min and 300 min of incubation at 38°C. Overall, there was a decrease in total motility at time 300 min ($P < 0.01$) and progressive motility at time 30 min ($P < 0.01$). The pH of the doses increased along the TRT ($P < 0.01$). Furthermore, males were classified, according to the pre-TRT progressive motility into Low (progressive motility $\leq 70\%$), Medium ($>70\% - <80\%$) and High ($\geq 80\%$). Doses from the class Low showed lower total and progressive motility at all times of the TRT than the classes Medium and High ($P \leq 0.05$), in addition to a greater drop in motility throughout the TRT. There was an interaction between the class of boars and TRT time for pH ($P = 0.03$), in which doses from the class Low showed an increase in pH at the 30min time ($P < 0.05$), while classes Medium and High showed an increase in 300min ($P < 0.05$). Plasma membrane integrity was influenced by TRT timing and class. There was a decrease in cells with intact membranes at 300min for all classes ($P = 0.03$). Class Low had lower plasma membrane integrity than classes Medium and High ($P < 0.01$). Acrosome integrity was influenced by TRT timing ($P = 0.04$), without significant effect of class or the interaction between the main factors. The severity of agglutinations increased after 300 min of TRT ($P < 0.05$) and was greater in the class Low ($P < 0.01$). Thus, the results suggested that TRT plays a key role in decreasing sperm quality and increasing pH; however, with differences between classes of boars.

Key-words: Acrosome. Plasma Membrane. Boar Semen. Semen Doses Quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Motilidade espermática e pH de doses de sêmen suíno antes e durante o teste de termorresistência (TTR), considerando todos os machos ($n = 33$).....	24
Tabela 2 – Integridade de membrana plasmática e de acrossoma de doses de sêmen suíno submetidas ao teste de termorresistência (TTR), de acordo com as classes de machos	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Valor médio de motilidade total e motilidade progressiva das classes (Baixa, Média e Alta) nos momentos de análise do TTR (AntesTTR, 30min e 300min)..... 25
- Figura 2 – Efeito da interação significativa ($P = 0,03$) entre momento e classe de macho sobre o pH das doses de sêmen suíno. 27
- Figura 3 - Gravidade do grau de aglutinação das doses de acordo com o momento da análise (A) e com a classe dos machos (B)..... 28

LISTA DE ABREVIACOES

CPS - Central de produção de smen;

CASA - Do inglês, *Computer Assisted Sperm Analysis*;

IA - inseminaco artificial

PI - Do inglês, *Propidium Iodide*;

PNA - Do inglês, *Peanut Agglutinin*;

r_p - Coeficiente de correlaco de Pearson;

r_s - coeficiente de correlaco de Spearman;

sptz - Espermatozoide;

TTR - Teste de termorresistência;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Inseminação Artificial	11
2.1.1	Sêmen <i>in natura</i> e doses inseminantes	11
2.2	Avaliação <i>in vitro</i> da qualidade espermática	12
2.2.1	Motilidade e concentração espermática	12
2.2.2	Morfologia espermática	13
2.2.3	Integridade de membrana plasmática e de acrossoma	14
2.2.4	pH das doses de sêmen	15
2.2.5	Teste de termorresistência.....	16
2.2.6	Aglutinações espermáticas	17
3	OBJETIVOS	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Animais e Instalações	19
4.2	Coleta e processamento de sêmen	19
4.3	Análise de motilidade espermática.....	19
4.4	Morfologia espermática e análise de integridade de acrossoma	20
4.5	Teste de termorresistência	20
4.6	Análise da integridade da membrana plasmática e de acrossoma.....	21
4.7	Análise de pH	22
4.8	Análise estatística.....	22
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	29
6.1	Motilidade espermática	29
6.2	Integridade de membrana plasmática e de acrossoma	29
6.3	pH das doses de sêmen	31
6.4	Gravidade de aglutinações espermáticas nas doses de sêmen	32
7	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura moderna usa inseminação artificial (IA) como parte integrante do manejo reprodutivo. A ampla disseminação da IA se deve, em grande parte, ao surgimento de linhagens genéticas e a qualidade exigida pela indústria de carne (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2018). Mas para que a IA ocorra de maneira correta e efetiva, é de extrema importância que a qualidade das doses inseminantes utilizadas no processo sejam asseguradas, sendo livres de contaminantes, tendo boas propriedades de armazenamento, capacidade de fecundação e sendo de alto valor genético (COLENBRANDER; FEITSMA; GROOTEN, 1993).

Nesse sentido, a avaliação do ejaculado, para posterior produção de doses inseminantes, deve incluir a mensuração do volume, concentração espermática, motilidade e morfologia. Além disso, como forma de assegurar a qualidade das doses durante todo o período de armazenamento, alguns testes *in vitro* podem ser realizados. Dentre eles, destacam-se a avaliação de motilidade e concentração, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e o teste de termorresistência (TTR) (SCHULZE *et al.*, 2018). Apesar de não ser utilizado com frequência nas centrais produtoras de sêmen (CPS), o TTR é um aliado na avaliação seminal e apresenta um papel importante na previsão da fertilidade do sêmen, uma vez que simula a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutor feminino (TARDIF *et al.*, 1999).

Outro fator que pode afetar a qualidade das doses inseminantes são as oscilações de pH, uma vez que o pH intracelular do espermatozoide está diretamente relacionado ao pH do meio em que o mesmo se encontra, logo, alterações no meio são capazes de influenciar consideravelmente a qualidade espermática (GATTI *et al.*, 1993).

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade das doses de sêmen suíno submetidas ao TTR de acordo com as mudanças de pH apresentadas e as alterações espermáticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminação Artificial

2.1.1 Sêmen *in natura* e doses inseminantes

A utilização do sêmen suíno em biotécnicas da reprodução vem sendo estudada desde o século passado. Os primeiros eventos de inseminação artificial (IA) em suínos foram realizados por Ilya Ivanov na Rússia e ocorreram por volta do século 30 (JOHNSON *et al.*, 2000). No entanto, a evolução da tecnologia foi lenta, sendo pouco utilizada ao longo das décadas de 60 e 70. Foi somente nos anos 90 que o emprego da técnica ganhou força, e passou de menos de 5% em 1986, para 30% em 1996 chegando a 50% em 1998 (LAMBERSON; SAFRANSKI, 2000). No Brasil, a IA em suínos começou a se desenvolver no ano de 1975 em criações da região sul do país, devido a mudanças estruturais na criação brasileira de suínos (BORTOLOZZO; WENTZ, 1997). Apesar das limitações de infraestrutura da época, a IA em suínos foi se disseminando pelas empresas comerciais e, no ano de 2000, o emprego da técnica já era uma realidade em quase todo o mundo, tendo aproximadamente 48% de todas as matrizes suínas inseminadas (JOHNSON *et al.*, 2000). Atualmente, a IA é a prática mais aplicada na reprodução suína e estima-se que nos maiores países produtores de suínos, 90% das fêmeas ou mais sejam inseminadas (WABERSKI *et al.*, 2019). Apesar da notável variação entre países, o nível de fertilidade alcançado com a IA pode ser atribuído ao avanço da tecnologia na produção de doses inseminantes, que permitiu monitorar e controlar a qualidade do sêmen, melhorando assim o desempenho reprodutivo (WABERSKI *et al.*, 2019).

A avaliação das doses inseminantes é de extrema importância para que a inseminação artificial ocorra de maneira adequada e surta os efeitos esperados. Por isso, um rigoroso padrão de avaliação deve ser estabelecido, a fim de garantir que as doses atinjam o padrão de qualidade esperado. O exame convencional do ejaculado em granjas comerciais visa avaliar a capacidade de fertilização do macho, incluindo a determinação da concentração, viabilidade, motilidade e morfologia espermática (TSAKMAKIDIS; LYMBEROPOULOS; KHALIFA, 2010). Cerca de 99% das inseminações realizadas são feitas com sêmen suíno diluído e armazenados a uma temperatura de 15-20°C (JOHNSON *et al.*, 2000). Os diluentes além de serem substâncias que permitem obter múltiplas doses de um único ejaculado (ESTIENNE; HARPER; DAY, 2007), também visam manter os espermatozoides viáveis até o momento da inseminação e têm como

fonte primária de energia a glicose (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). Os diluentes podem ser classificados de acordo com sua capacidade de preservar as células espermáticas, podendo ser de curta duração (1-2 dias), média duração (3-4 dias) ou longa duração (7-10 dias) (KARAGEORGIU *et al.*, 2016). Eles devem apresentar substâncias tais como nutrientes fornecedores de energia, protetores contra os choques de temperatura, tampões para o controle do pH, controladores de pressão osmótica e antibióticos para inibir o crescimento bacteriano (PEZO *et al.*, 2019). A correta preparação e o tipo de diluente usado para a diluição dos ejaculados são condições importantes para a correta preservação e garantia da qualidade do sêmen durante o armazenamento (SCHULZE; JUNG; HENSEL, 2022). Considerando-se um total de aproximadamente 2 milhões de fêmeas suínas no plantel brasileiro tecnificado, estima-se que cerca de 12 milhões de doses de sêmen sejam produzidas anualmente. Desta forma, para garantir bons resultados com a realização da IA, é necessário assegurar a qualidade mínima das doses de sêmen (ABPA, 2022).

2.2 Avaliação in vitro da qualidade espermática

2.2.1 Motilidade e concentração espermática

O sêmen possui várias características microscópicas e macroscópicas que devem ser avaliadas a fim de garantir bons resultados na hora da inseminação, sendo as principais características: a cor, o odor, o volume, o pH, a concentração, a morfologia e a motilidade espermática. A motilidade é um dos principais parâmetro de avaliação da qualidade do sêmen, uma vez que é uma medida indireta da viabilidade espermática e apresenta importantes características a serem usadas para avaliar o potencial dos espermatozoides para se mover através do trato genital feminino e penetrar o oócito (FOXCROFT *et al.*, 2008). A avaliação de motilidade pode ser realizada por meio da utilização de métodos convencionais, utilizando-se microscópio de luz, ou por meio de sistema computadorizado de avaliação de sêmen (CASA, *Computer-Assisted Sperm Analysis*) (DIDION, 2008). A utilização de sistema CASA, nas avaliações de motilidade e concentração espermática, proporciona o aumento da acurácia e padronização das análises. Flowers (1997) concluiu que os valores de motilidade espermática entre 66,2% e 94,7 %, não alteraram as taxas de parto e o tamanho das leitegadas; dessa forma, preconiza-se que as doses sejam produzidas a partir de ejaculados com pelo menos 70% de motilidade total. Além disso, é necessário monitorar a motilidade das doses produzidas

considerando os efeitos de seu transporte e armazenamento, uma vez que o processo do transporte pode gerar danos as células espermáticas dependendo de como for realizado (SCHULZE *et al.*, 2018).

Além dos padrões de motilidade, a determinação da concentração espermática é essencial para avaliação da qualidade do ejaculado, uma vez que é um parâmetro quantitativo que, aliado ao volume, permite calcular o número de doses a serem produzidas por um certo ejaculado (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). Dentre as principais maneiras de fazer a análise da concentração espermática, destacam-se a contagem direta em câmara hemocitométrica, fotolorimetria, espermodensímetro, contagem eletrônica de partículas ou pelo sistema CASA (MELLAGI *et al.*, 2019). Apesar das técnicas de contagem de células serem consideradas mais confiáveis para a adequada mensuração das amostras (VIANNA *et al.*, 2004), elas perdem espaço dentro das centrais de produção de sêmen por serem mais demoradas quando comparadas a outros métodos de avaliação. O método mais frequentemente utilizado entre as CPS é a análise com o uso do sistema CASA (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012) que proporciona o aumento da acurácia e padronização das análises.

2.2.2 Morfologia espermática

A morfologia espermática, associada com a avaliação da concentração e motilidade são os principais componentes da avaliação rotineira da qualidade do sêmen suíno (SUTKEVICIENE *et al.*, 2009). Este exame tem como objetivo a avaliação qualitativa das células espermáticas a fim de determinar o percentual de alterações morfológicas que os espermatozoides podem apresentar (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). O ejaculado de reprodutores suínos normalmente apresenta uma certa quantidade de espermatozoides que irão apresentar alguma anormalidade morfológica. Porém, um impacto significativo sobre a fertilidade é observado apenas quando as alterações excedem o limite considerado aceitável (JUNG; RÜDIGER; SCHULZE, 2015). As alterações dos espermatozoides observadas no exame podem ser denominadas como alterações primárias, secundárias ou terciárias, dependendo da sua origem. As alterações primárias consistem em alterações produzidas no testículo durante a espermatogênese ou espermiogênese; as secundárias são aquelas que acontecem no epidídimo durante a maturação do espermatozoide e as terciárias são aquelas provenientes devido a manipulação do sêmen (preparação de doses seminais, refrigeração) (BONET; BRIZ; YESTE, 2012). Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio

Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), os parâmetros considerados normais para o sêmen refrigerado são de até 20% de alterações morfológicas totais. Quando separadas por região do espermatozoide, preconiza-se que haja no máximo até 5% de alterações de cabeça, colo, acrossoma e peça intermediária, e 10% para gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda dobrada ou enrolada (MELLAGI *et al.*, 2019). Existem inúmeras razões para subfertilidade ou infertilidade em suínos que podem ser atribuídas à qualidade do sêmen (BONET, 1990), portando, para avaliar adequadamente a capacidade de fertilização dos espermatozoides, é necessário determinar se as células espermáticas apresentam parâmetros adequados e alterações morfológicas dentro dos limites aceitáveis.

2.2.3 Integridade de membrana plasmática e de acrossoma

A avaliação da integridade da membrana plasmática é um ponto importante na avaliação *in vitro* dos espermatozoides e pode garantir informações importantes sobre a qualidade seminal. O aumento na permeabilidade da membrana torna o espermatozoide incapaz de manter a concentração intracelular necessária e impossibilita o correto funcionamento da célula, e por isso, a presença de uma membrana celular intacta é crucial para o adequado comportamento da célula espermática (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). Os métodos de avaliação se fundamentam na capacidade das membranas plasmáticas impedirem ou não a entrada de determinados corantes ou sondas fluorescentes no interior da célula espermática (SILVA; GADELLA, 2006). O uso de corantes específicos para a microscopia ótica como por exemplo a eosina-nigrosina e a azul de bromofenol foram muito utilizados para detectar os espermatozoides viáveis e não viáveis quanto a permeabilidade das membranas, porém, como esses métodos se provaram inapropriados, outras técnicas mais eficazes foram desenvolvidas a fim de substituir os corantes convencionais (BONET; BRIZ; YESTE, 2012). Dessa maneira, a técnica de coloração utilizando corantes ou sondas fluorescentes ganhou espaço na avaliação de membrana plasmática; porém tornou necessária a utilização do uso de microscópio de fluorescência ou citômetro de fluxo (JOHNSON *et al.*, 2000). Há uma grande variedade de substâncias de coloração fluorescente para testar essa integridade, como o iodeto de propídio (PI), diacetato de carboxifluoresceína, SYBR-14 e Hoechst 3358 (GADEA, 2005). Além de existir a possibilidade de combinar as sondas entre si para trazer resultados ainda melhores na avaliação da membrana plasmática, esse tipo de técnica traz vantagens na hora da análise, uma

vez que automatiza o processo através da citometria de fluxo e torna a avaliação mais rápida (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

A análise da membrana acrossomal é uma avaliação que pode ser utilizada como indicativo da viabilidade espermática e da qualidade do armazenamento das doses de sêmen (JOHNSON *et al.*, 2000). Por ser parte fundamental do processo de fecundação, espera-se que o acrossoma dos espermatozoides esteja intactos para fecundar o oócito de maneira adequada. Degenerações ou danos ao acrossoma podem significar a perda da capacidade fecundante, causando um impacto importante na qualidade seminal. O acrossoma pode ser avaliado conjugando lectinas com fluorocromos (BONET; BRIZ; YESTE, 2012), sendo que, aqueles espermatozoides que tiveram seus acrossomas reagidos fixarão a lectina fluorescente (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). Além disso, o acrossoma também pode ser avaliado através da fixação de amostras em solução de formol-citrato de sódio e analisado com o auxílio de microscopia de contraste de fase no aumento de 1000x, a fim de avaliar individualmente as células em busca de defeitos no acrossoma, como por exemplo acrossomas reagidos, com defeitos ou ausentes (PURSEL; JOHNSON; RAMPACEK, 1972).

2.2.4 pH das doses de sêmen

O pH do sêmen da espécie suína é levemente alcalino, e varia em torno de 7,3 a 7,9 (AX *et al.*, 2016). O pH intracelular do espermatozoide está diretamente relacionado ao pH do meio em que o mesmo se encontra, logo, alterações no meio são capazes de influenciar consideravelmente a qualidade espermática (GATTI *et al.*, 1993). As variações de pH são muito importantes durante o preparo das doses, pois têm o potencial de influenciar na longevidade. O pH pode ser influenciado de acordo com o nível de contaminação das doses e também conforme o metabolismo espermático, sendo que tanto o aumento quanto a diminuição do pH podem levar a consequências negativas que irão diminuir a qualidade da dose produzida. A diminuição do pH pode ser um indicativo de contaminação bacteriana (ALTHOUSE *et al.*, 2000), uma vez que as bactérias produzem ácido láctico durante seu metabolismo e o aumento da concentração dessa substância pode levar a redução do pH do meio, reduzindo tanto o metabolismo, quanto a motilidade do espermatozoide (GADEA, 2003) e consequentemente comprometendo a qualidade das doses. Já o aumento do pH, normalmente pode ser causado pela perda de CO₂ para o ambiente e está diretamente ligado a quantidade de ar presente dentro da embalagem da dose de sêmen (VYT *et al.*, 2007).

O metabolismo glicolítico do espermatozoide leva a redução do pH intracelular e, como resultado, à supressão do metabolismo celular. O ácido lático é o principal metabólito desse processo e pode ser utilizado como indicador da qualidade do sêmen (RIGAU *et al.*, 1996). Dessa forma, se torna necessária a adição de tamponantes para auxiliar no controle do pH das doses inseminantes. Os tampões utilizados podem ser o bicarbonato e o citrato de sódio, que são mais simples e apresentam uma capacidade tamponante limitada ou tampões mais complexos como o HEPES e o Tris que podem fazer o controle do pH em uma faixa mais ampla (GADEA, 2003). Sendo assim, a correta escolha e preparação dos diluentes podem ser pontos-chaves para evitar os efeitos prejudiciais que a oscilação de pH possa trazer para a preservação do sêmen.

2.2.5 Teste de termorresistência

Além da análise de motilidade convencional, também é possível avaliar a qualidade das doses inseminantes a partir do teste de termorresistência (TTR). O TTR é utilizado com intuito de avaliar a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutor feminino (TARDIF *et al.*, 1999), uma vez que a motilidade é um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no oócito. A termorresistência pode indicar a capacidade do espermatozoide de suportar o estresse térmico presente na tuba uterina da fêmea, e assim desempenhar um papel importante na previsão da fertilidade do sêmen (SCHULZE *et al.*, 2019).

O teste é realizado a partir da incubação de uma amostra de dose de sêmen a uma temperatura de 37°C por 180 min (LARSSON; ERSMAR, 1980), a 42,5°C por 45 min (FISER *et al.*, 1991) a 38°C por 120 min (MENEGAT *et al.*, 2017) ou 38°C podendo ser analisado após 30 min e 300 min de incubação (SCHULZE *et al.*, 2019). Após esse tempo, os espermatozoides com um metabolismo funcional estarão móveis e apresentando uma motilidade adequada para a fecundação. O sistema CASA é um poderoso aliado para avaliar e determinar a resistência dos espermatozoides ao estresse térmico durante o teste de TTR (SCHULZE *et al.*, 2021), mas por ser um teste que demanda um certo tempo devido ao seu longo período de incubação, ele não é rotineiramente utilizado nas CPS. Sua utilidade basicamente é aplicada a trabalhos experimentais, podendo ser útil para elucidar diversos aspectos, como por exemplo o impacto do estresse oxidativo sobre os parâmetros espermáticos (MENEGAT *et al.*, 2017) ou até mesmo para avaliar o efeito das células espermáticas mortas

na qualidade final do sêmen de suínos (QUIRINO *et al.*, 2022b), entre tantas outras possibilidades.

Assim como descrito em outras espécies, bovinos e equinos (MACÊDO *et al.*, 2021; TALINI *et al.*, 2019), a motilidade durante o TTR diminui conforme aumenta o tempo de incubação. Acredita-se que a diminuição da motilidade esteja relacionada com o fato do TTR proporcionar a reativação do metabolismo normal dos espermatozoides, ocasionando no consumo de fontes energéticas presentes no diluente e gasto de energia celular (JONES; BAVISTER, 2000).

2.2.6 Aglutinações espermáticas

A aglutinação espermática é um fenômeno frequentemente encontrado no sêmen suíno (BOLLWEIN *et al.*, 2004). Geralmente são ocasionadas pelo contato cabeça a cabeça e classificadas de acordo com o número observado por campo no microscópio. Durante a avaliação são atribuídos escores que variam de 0 a 3 de acordo com o número de aglutinações observadas em um campo, podendo variar de acordo com o aumento utilizado e a abertura do campo do microscópio. Dessa maneira, quando uma amostra apresentar ausência de aglutinações é atribuído o grau 0. Quando o número de aglutinações é de 1 a 2, 3 a 5 e >6 por campo são atribuídos graus de 1, 2 e 3, respectivamente (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

Embora o conhecimento sobre a área ainda seja escasso, alguns autores realizaram trabalhos experimentais a fim de descobrir as possíveis causas das aglutinações (ALTHOUSE *et al.*, 2000; HARAYAMA *et al.*, 1994). Ainda que a aglutinação tenha um efeito negativo claro sobre a motilidade espermática, (BOLLWEIN *et al.*, 2004) não encontraram efeitos da aglutinação sobre a fertilidade e relatam que esse efeito não foi encontrado, pois as aglutinações foram desfeitas após a diluição. Portanto, é fundamental que a análise seja realizada após a diluição.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as modificações da qualidade das doses de sêmen suíno submetidas ao TTR, em termos de pH e alterações espermáticas. Além disso, buscou-se comparar o desempenho ao TTR de diferentes classes de machos de acordo com a motilidade progressiva inicial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Instalações

O ejaculado de 33 reprodutores suínos (AGPIC 337® - Agrocere PIC, Patos de Minas, MG, Brasil), da Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS – Estrela, Rio Grande do Sul), foi utilizado no 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.

4.2 Coleta e processamento de sêmen

Cada ejaculado foi obtido por sistema semiautomático 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 (AndroVision CASA System, Minitub GmbH). As análises de motilidade e concentração foram feitas pelo sistema CASA em câmaras de contagem de 20 μ m de profundidade (Leja®, Nieuw-Vennep, Holanda).

Após as análises iniciais, o diluente Androstar Plus® (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), pré-aquecido a 36°C, foi adicionado ao sêmen, para produção de doses de 1,5 bilhão de células totais em um volume final de 45 mL em flexitubo de capacidade total de 60 mL.

Após o envase, as doses foram transportadas ao Setor de Suínos (Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS), por um período de 120 min, acondicionadas em caixa de transporte com temperatura controlada entre 22 e 24°C e posteriormente foram mantidas sob resfriamento (\sim 17°C) por um período total de 48 horas.

4.3 Análise de motilidade espermática

As análises de motilidade das doses foram realizadas no sistema CASA (AndroVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha) em câmaras de contagem de 20 μ m de profundidade

(Leja[®], Nieuw-Vennep, Holanda). Inicialmente, para a avaliação da qualidade das doses após 48h da produção (antes do TTR), uma alíquota de 1 mL de cada dose foi aquecida a 37 °C por 20 minutos. A câmara de contagem foi preenchida por capilaridade com 3 µL de sêmen diluído e cinco campos foram analisados, utilizando-se um microscópio de contraste de fase, com platina aquecida a 37°C, em aumento de 200 × (Axio Scope A1, Zeiss[®] Germany). Todos os materiais que entraram em contato com as células espermáticas foram previamente aquecidos a 37°C. A detecção das células espermáticas foi ajustada para área de cabeça de 10 a 80 mm² e fator de forma de 1,2 a 5. Espermatozoides com amplitude de deslocamento lateral da cabeça <1 mm e velocidade curvilínea <24 mm/s foram considerados imóveis. Motilidade progressiva foi definida com a velocidade curvilínea > 40 mm/s e velocidade em linha reta >10mm/s. Durante as avaliações, os graus de aglutinação foram registrados para cada amostra, seguindo a classificação: sem aglutinações em todos os campos avaliados (0), uma a duas aglutinações por campo avaliado (1), três a cinco aglutinações por campo avaliado (2) e 6 ou mais aglutinações por campo avaliado (3) Clique ou toque aqui para inserir o texto.

4.4 Morfologia espermática e análise de integridade de acrossoma

A avaliação da morfologia espermática das doses foi realizada nas 48 h de armazenamento (AntesTTR). Uma alíquota de 400 µL da dose foi fixada em 1mL de solução de formol-citrato de sódio (2,94%) e posteriormente avaliada por microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, analisando 200 células espermáticas por amostra. Foram avaliados os defeitos de acrossoma, cabeça, colo, peça intermediária, gota citoplasmática distal, gota citoplasmática proximal, cauda dobrada e cauda enrolada 2

4.5 Teste de termorresistência

O teste de termorresistência (TTR) foi realizado após a avaliação de motilidade e concentração nas 48h de armazenamento, de acordo com o protocolo adaptado de Schulze *et al.* (2017). Incubou-se uma alíquota de 10 mL de cada dose a 38 °C em banho-maria (DeLeo BMED, RS, Brazil). A avaliação da motilidade espermática foi realizada após 30 e 300 minutos de incubação, usando o sistema CASA de acordo com os métodos descritos anteriormente.

4.6 Análise da integridade da membrana plasmática e de acrossoma

As análises de integridade de membrana plasmática e de acrossoma foram realizadas antes do TTR e após 30 min e 300 min de incubação do TTR, utilizando-se citometria de fluxo, seguindo o protocolo de Quirino *et al.*, (2022a). Uma alíquota de 230 μL (contendo $\sim 30 \times 10^6$ espermatozoides/mL) de dose inseminante foi acrescida de 5 μL de *Arachis hypogaea* (peanut) agglutinin-Alexa Fluor 647 (PNA-647, na concentração final da amostra de 9,0 μM) e de iodeto de propídio (PI, concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$) e incubados, sob abrigo da luz, a 38°C em banho-seco (K80-D01, Kasvi[®], São José dos Pinhais, PR, Brasil) por 10 min. Após a incubação, uma alíquota de 30 μL de cada amostra foi diluída em 1mL de Androstar Plus[®] pré-aquecido a 38°C, obtendo-se uma concentração final de $\sim 0,9 \times 10^6$ espermatozoides/mL, e analisadas por citometria de fluxo, utilizando-se o citômetro BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, San Jose, USA), o qual possui dois lasers, azul (488nm, 20mW) e vermelho (640nm, 12.5mW); e 4 detectores: 533/30nm (FL1, filtro band pass), 585/40nm (FL2, filtro band pass), 670nm (FL3, filtro long pass) e 675/25nm (FL4, filtro band pass). Um total de 10.000 eventos, dentro do *gate* de espermatozoides, foi obtido por amostra e todos os sinais de fluorescência foram plotados em escala logarítmica. O *gate* das populações foi selecionado baseado em um pool de amostras previamente corado com SYBR-14.

Para o estabelecimento de *gates* para os fluorocromos utilizados, um pool de amostras de dose inseminantes foi utilizado para preparação de controle não marcado, controle negativo e controle positivo. Para o controle positivo para PNA-647 e para PI, o pool de amostras foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento (*flash-frozen*) em freezer -80°C e depois acrescido de PNA-647 ou de PI, passando pelo mesmo período e temperatura de incubação citados anteriormente. O controle negativo para PNA-647 e PI consistia no pool de amostras marcado com PNA-647 ou PI, incubado pelo mesmo período e temperatura citados anteriormente. O controle não marcado consistia no pool da amostra sem a adição dos fluorocromos.

Os sinais de fluorescência para PNA-647 foram lidos no detector FL4 e os sinais de fluorescência para o PI foram lidos no detector FL3. Eventos que apresentaram uma maior intensidade de fluorescência no detector FL4 (fluorescência a partir de 10^4), foram considerados positivos para PNA-647, ou seja, com acrossoma não integro, uma vez que o PNA consegue se ligar somente a membrana acrossomal externa somente quando ela está lesionada (BOEHANSEN; SATAKE, 2019). Já eventos que apresentaram uma alta intensidade de

fluorescência no detector FL3 (fluorescência a partir de 10^4), foram considerados positivos para PI, indicando membrana plasmática não íntegra, visto que PI é uma sonda capaz de permear apenas células com membrana plasmática lesionada (BOE-HANSEN; SATAKE, 2019). Todos os dados foram armazenados e avaliados utilizando-se o software do citômetro BD Accuri C6 Plus. Além disso, o equipamento foi calibrado, com *beads* específicas para calibração comercializadas pelo próprio fornecedor, anteriormente à análise das amostras desse experimento, para garantir o alinhamento óptico e fluídico do sistema.

4.7 Análise de pH

A aferição do pH foi realizada no momento de abertura das doses, para avaliação antes do TTR, e nos momentos 30 min e 300 min de incubação do TTR. Para tal procedimento, foi utilizado um pH-metro de indicação digital (K39-2014B Kasvi[®], São José dos Pinhais, PR, Brasil) previamente calibrado, com os tampões de pH 4,01; 7,00 e 10,01, segundo as instruções do fabricante. O eletrodo foi lavado com água destilada após a análise de cada amostra.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o pacote estatístico SAS, versão 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). As diferenças foram consideradas significantes quando $P \leq 0,05$. Modelos lineares generalizados mistos (proc GLIMMIX) foram utilizados para análise de dados normais e não normais. Os gráficos dos resíduos de cada variável foram verificados quanto à distribuição. Distribuição binomial foi utilizada para as motilidades espermáticas, integridade de membrana plasmática e acrossomal e total de células com defeitos morfológicos. O pH das doses de sêmen foi analisado como distribuição normal, enquanto as aglutinações espermáticas foram analisadas como distribuição multinomial ordinal. O teste de Tukey-Kramer foi utilizado para as comparações múltiplas das médias, exceto para aglutinação, em que foi analisado por regressão logística. Para determinar a associação entre as motilidades espermáticas e as demais variáveis quantitativas, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson, enquanto coeficientes de correlação de Spearman foram utilizados entre aglutinação e motilidades espermáticas.

Os machos foram classificados de acordo com a motilidade progressiva antes do TTR em: Baixa (motilidade progressiva $\leq 70\%$), Média (motilidade progressiva $>70 - <80\%$) e Alta

(motilidade progressiva $\geq 80\%$), obtendo-se uma distribuição aproximada de 25%, 50% e 25% dos machos, respectivamente. Para a comparação das classes de machos as análises seguiram um fatorial 3×3 , em que os fatores fixos foram os três níveis de classe (Baixa, Média e Alta), três momentos de incubação (AntesTTR, 30 min, e 300min) e a interação entre classe e momento. Os machos foram incluídos como efeito aleatório nos modelos.

5 RESULTADOS

Os dados de motilidades espermáticas e pH das doses estão descritos na Tabela 1. Houve decréscimo significativo da motilidade total ($P < 0,01$) após 300 min de incubação no TTR. Já para a motilidade progressiva, a redução foi observada após 30 min de incubação ($P < 0,01$). O pH das doses de sêmen aumentou conforme aumentou-se o tempo de incubação ($P < 0,01$).

Tabela 1 – Motilidade espermática e pH de doses de sêmen suíno antes e durante o teste de termorresistência (TTR), considerando todos os machos ($n = 33$)

	AntesTTR	30min	300min	P - valor
Motilidade total, %	78,8 ± 2,2 ^a	78,2 ± 2,3 ^a	75,2 ± 2,5 ^b	<0,01
Motilidade progressiva, %	70,8 ± 3 ^a	68,9 ± 3,1 ^b	68,7 ± 3,2 ^b	<0,01
pH	7,04 ± 0,01 ^a	7,08 ± 0,01 ^b	7,26 ± 0,01 ^c	<0,01

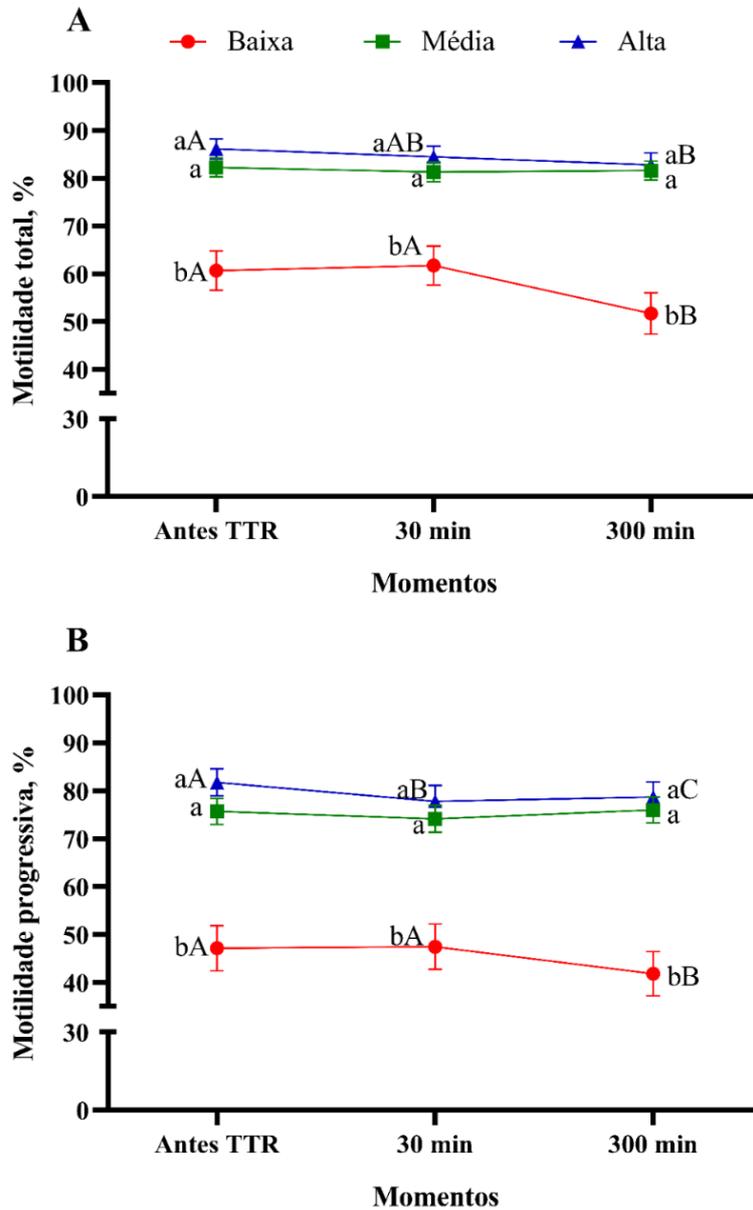
TTR: teste de termorresistência incubando-se 10 mL da amostra a 38°C.

^{abc} letras diferentes significam diferença estatística entre os momentos ($P < 0,05$).

O coeficiente de correlação de Pearson (r_p) entre a motilidade total e a motilidade progressiva foi muito forte e positivo ($r_p=0,98$; $P < 0,01$). Quando se analisou a correlação entre a motilidade total e o pH, obteve-se um coeficiente fraco e negativo ($r_p=-0,26$; $P < 0,05$), sugerindo-se que à medida que o pH aumenta, a motilidade total decresce. Pelo coeficiente de correlação de Spearman (r_s), a presença de aglutinações foi negativamente correlacionada com as motilidades total e progressiva ($r_s=-0,49$ e $-0,41$, respectivamente; $P < 0,01$).

Quando se compararam as classes de machos de acordo com a motilidade progressiva (Baixa, Média e Alta), observou-se que houve interação significativa entre momento e classes de machos para a motilidade espermática (Figura 1, A e B). Em todos os momentos de TTR, as motilidades espermáticas (total e progressiva) foram superiores para as classes Média e Alta quando comparadas à classe Baixa. No entanto, a redução das motilidades espermáticas a longo do TTR diferiu entre as classes. Para a classe Baixa, houve um decréscimo significativo ($P \leq 0,05$) de motilidade total e da progressiva no momento 300min. Para a classe alta, houve decréscimo significativo da motilidade total após 300 min e na motilidade progressiva, após 30 min de incubação. Para a classe Média, não houve influência do momento, em que ambas as motilidades se mantiveram sem variação significativa ($P > 0,05$).

Figura 1 – Valor médio de motilidade total e motilidade progressiva das classes (Baixa, Média e Alta) nos momentos de análise do TTR (AntesTTR, 30min e 300min)



Machos foram divididos em classes de acordo com a motilidade progressiva antes do TTR em Baixa ($\leq 70\%$), Média ($> 70\%$ e $< 80\%$) e Alta ($\geq 80\%$).

TTR: teste de termorresistência incubando-se 10 mL da amostra a 38°C .

a,b: significam diferença estatística entre classes ($P < 0,05$) dentro de cada momento do TTR.

A,B: significam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$) dentro da mesma classe de macho.

A integridade de membrana plasmática foi influenciada pelo momento de análise e pela classe de machos, sem efeito significativo da interação entre os fatores (Tabela 2). Sendo que, houve uma diminuição significativa na porcentagem de células com membrana plasmática íntegra 300min de incubação ($P = 0,03$). Além disso, houve diferença significativa na porcentagem de células com membrana plasmática íntegra de acordo com as classes ($P < 0,01$). Machos com classificação Baixa apresentaram uma porcentagem de células com membrana plasmática íntegra significativamente menor que machos de classificação Média e Alta ($P < 0,01$).

A integridade de acrossoma foi influenciada pelo momento da análise ($P = 0,04$), sem efeito significativo da classe de machos ou da interação entre os fatores (Tabela 2). Sendo que, a porcentagem de células espermáticas com acrossoma íntegro foi menor no momento 30min quando comparado aos demais ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Integridade de membrana plasmática e de acrossoma de doses de sêmen suíno submetidas ao teste de termorresistência (TTR), de acordo com as classes de machos

	Classes de Machos			LSMeans	P - valor		
	Baixa	Média	Alta		Mom	Classe	Mom × Classe
<i>Integridade membrana plasmática, %</i>							
Antes TTR	81,9±2,7	91,0±1,1	90,2±1,6	88,2±1,0 ^A	0,03	<0,01	0,30
30 min	82,2±2,6	90,7±1,2	90,3±1,6	88,2±1,0 ^A			
300 min	78,5±3,0	88,5±1,4	88,3±1,9	85,6±1,2 ^B			
LSMeans	80,9±2,8 ^a	90,2±1,2 ^b	89,6±1,7 ^b				
<i>Integridade de acrossoma, %</i>							
Antes TTR	90,0±2,1	90,1±1,6	88,3±2,4	89,5±2,0 ^A	0,04	0,42	0,06
30 min	89,2±2,2	88,0 ±1,9	84,7±3,0	87,4±1,7 ^B			
300 min	91,8±1,7	89,0±1,8	84,8±3,0	88,9±2,8 ^A			
LSMeans	90,4±2,0	89,1±1,7	86,0±2,8				

TTR: teste de termorresistência incubando-se 10 mL da amostra a 38°C.

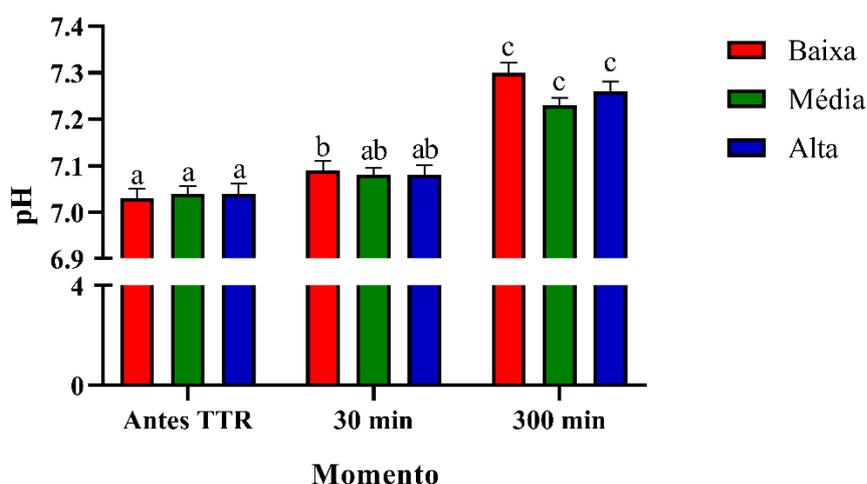
Machos foram divididos em classes de acordo com a motilidade progressiva antes do TTR em Baixa ($\leq 70\%$), Média ($> 70\%$ e $< 80\%$) e Alta ($\geq 80\%$).

^{A,B}: diferença estatística entre momentos ($P \leq 0,05$).

^{a,b}: diferença estatística entre classes ($P \leq 0,05$).

Para o pH das doses, houve interação significativa entre momento de análise e classe de machos ($P = 0,03$; Figura 2). Não houve diferença significativa de valores de pH entre as classes de machos dentro do mesmo momento de análise. No entanto, o pH aumentou ao longo do TTR de forma diferente entre as classes. Enquanto que, para a classe Baixa, o pH aumentou após 30 min, o pH de doses de machos das classes Média e Alta foi maior após 300min de incubação.

Figura 2 – Efeito da interação significativa ($P = 0,03$) entre momento e classe de macho sobre o pH das doses de sêmen suíno



TTR: teste de termorresistência incubando-se 10 mL da amostra a 38°C.

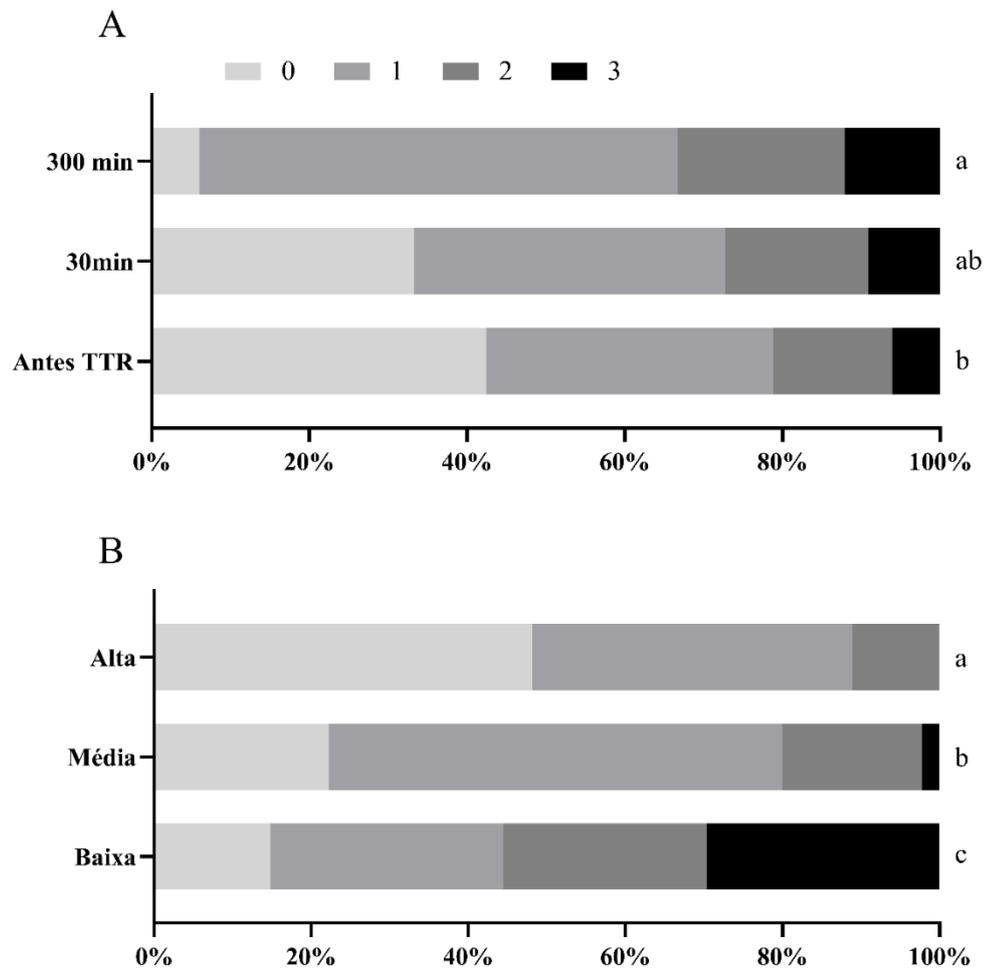
Machos foram divididos em classes de acordo com a motilidade progressiva antes do TTR em Baixa ($\leq 70\%$), Média ($> 70\%$ e $< 80\%$) e Alta ($\geq 80\%$).

a,b,c: indicam diferença significativa entre os momentos e entre classes ($P < 0,05$).

Momento: $P < 0,01$; Classe de macho: $P = 0,61$.

Houve diferença significativa (Figura 2^a; $P = 0,01$) da frequência de gravidade de aglutinações (0, 1, 2 e 3) apresentada entre os momentos de análise sendo que o momento de análise 300min apresentou maior gravidade de aglutinações do que AntesTTR ($P < 0,05$). Além disso, quando se avaliou a gravidade de aglutinações de acordo com a classe de macho, houve diferença significativa (Figura 2B; $P < 0,01$) entre as classes, sendo que a classe Baixa apresentou maior gravidade de aglutinações, seguida da classe Média e Alta.

Figura 3 - Gravidade do grau de aglutinação das doses de acordo com o momento da análise (A) e com a classe dos machos (B)



0: sem aglutinação; 1: uma a duas aglutinações por campo avaliado; 2: três a cinco aglutinações por campo avaliado; 3: 6 ou mais aglutinações por campo avaliado.

TTR: teste de termorresistência incubando-se 10 mL da amostra a 38°C.

Machos foram divididos em classes de acordo com a motilidade progressiva antes do TTR em Baixa ($\leq 70\%$), Média ($> 70\%$ e $< 80\%$) e Alta ($\geq 80\%$).

a e b indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os momentos de análise (A).

a, b e c indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as classes de machos (B).

Também, quando se avaliou a correlação entre presença de aglutinações e integridade de membrana plasmática e presença de aglutinações e integridade de acrossoma, houve associação negativa da integridade de membrana plasmática com a presença de aglutinações ($r_s = -0,41$; $P < 0,01$), mas não houve associação com integridade de acrossoma ($P = 0,75$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Motilidade espermática

A motilidade total e a motilidade progressiva são dois parâmetros importantes usados para avaliar a qualidade do sêmen suíno durante o processo de inseminação artificial, uma vez que trazem informações relevantes sobre quais espermatozoides são considerados mais eficientes em progredir em direção ao oócito e realizar a fecundação. No presente trabalho, tanto a motilidade total quanto a progressiva foram influenciadas pelo teste de termorresistência e apresentaram decréscimo significativo ao final do TTR. Esse padrão de resultados é esperado e já foi evidenciado em trabalhos realizados anteriormente (MENEZES *et al.*, 2020; SCHULZE *et al.*, 2019).

O TTR também pode ser responsável por afetar a atividade metabólica dos espermatozoides, esgotando as fontes de energia utilizadas na movimentação, levando a diminuição da motilidade ao longo do teste (MENEZES *et al.*, 2020; SCHULZE *et al.*, 2019). Já a comparação entre a motilidade das diferentes classes de machos demonstrou que os machos que anteriormente à realização do TTR foram classificados como baixos também foram os que apresentaram as maiores reduções de motilidade ao final do teste, sugerindo que as células espermáticas de machos com menores níveis de motilidade inicial tenham menos resistência ao desafio térmico.

6.2 Integridade de membrana plasmática e de acrossoma

A integridade de membrana plasmática é essencial para o metabolismo, capacitação, reação acrossomal e para a interação entre espermatozoide e oócito (WYSOKIŃSKA; SZABLICKA, 2021). A estrutura da membrana plasmática e do acrossoma podem ser alteradas por fatores como: temperatura e osmolaridade do diluente para preparação da dose, curva de resfriamento para armazenamento da dose produzida e pelo tempo de armazenamento (MENEGAT *et al.*, 2017; SCHMID *et al.*, 2013; SCHULZE *et al.*, 2019).

O processo de envelhecimento dos espermatozoides ocorre *in vitro*, durante o armazenamento, e *in vivo*, após a inseminação, no período em que os espermatozoides permanecem no reservatório da junção útero-tubária (DE AMBROGI *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2005). Em ambos os momentos, o envelhecimento do

espermatozoide é responsável por uma série de alterações estruturais, dentre elas podem-se citar a alterações envolvendo a membrana plasmática e o acrossoma (DE AMBROGI *et al.*, 2006)

De Ambrogi *et al.* (2006) avaliaram a integridade de membrana plasmática ao longo de 96 h de armazenamento de doses produzidas em MR-A (diluyente de longa duração) e obtiveram uma diminuição significativa da porcentagem de células com membrana íntegra nas 72h e nas 96h de armazenamento. Wysokińska; Szablicka, (2021) avaliaram a integridade de membrana plasmática de doses produzidas em Biosolvens Plus (diluyente de longa duração) ao longo de 96h de armazenamento e obtiveram uma redução da integridade de membrana plasmática nas 96h de armazenamento ($P \leq 0,05$) para machos da raça Pietrain. Já Waberski *et al.* (2019), não encontraram diferença significativa para integridade de membrana e de acrossoma de doses produzidas com BTS e com Androstar Premium armazenadas por um período de 72h ($P = 0,238$). No presente trabalho, a exposição prolongada a altas temperaturas (38°C) foi associada com a diminuição das células com membrana íntegra. No entanto, essa diminuição de células com membrana íntegra foi de apenas 3%. Vale salientar que as doses foram produzidas com diluyente considerado de longa duração e o teste foi realizado com doses de 48 h de armazenamento. Assim, o metabolismo e a fluidez de membrana espermática podem ser mais afetados pelo TTR em doses com maior tempo de produção e/ou em diluyente de menor proteção. Houve também uma correlação forte e positiva entre motilidade progressiva e integridade de membrana ($r_p = 0,80$; $P < 0,01$), mostrando-se que se espera que amostras com alta motilidade espermática tenham também alta integridade de membrana plasmática

Já a integridade de acrossoma não diferiu entre as classes de machos e não foi associado com a motilidade espermática progressiva ($r_p = 0,17$; $P = 0,09$). A resposta da integridade de acrossoma ao TTR também não foi conclusiva, visto que houve uma ligeira redução após 30min, com recuperação após 300 min de incubação. O mecanismo pelo qual há danos na integridade do acrossoma não é completamente elucidado. O aumento de permeabilidade plasmática causa um aumento de cálcio intracelular, que induz desestabilização semelhante à capacitação na membrana, resultando em reação acrossomal prematura (PINART; PUIGMULÉ, 2013). Como no presente estudo a perda de integridade de membrana não foi tão severa, é possível que o estímulo não tenha sido suficiente para danificar o acrossoma.

6.3 pH das doses de sêmen

Visto que o pH do ejaculado suíno varia entre 7,2 e 7,5 e que abaixo dessa faixa a motilidade e o metabolismo dos espermatozoides é reduzido (JOHNSON *et al.*, 2000), os resultados obtidos no presente estudo já eram esperados. Como a função do TTR é induzir a reativação do metabolismo espermático para posterior aferição da motilidade espermática, objetivando a estimação da capacidade fecundante das doses inseminantes (SCHULZE *et al.*, 2019), o que se espera é que o pH das doses antes da submissão ao TTR seja menor e que ao longo do TTR ocorra o aumento do pH. Já que, até o momento, não há estudos que tenham aferido o pH de doses inseminantes durante o TTR, o presente trabalho conseguiu mostrar que há diferença significativa entre os valores de pH apresentados Antes TTR, 30min e 300min.

Esse resultado corrobora com Vyt *et al.* (2007), os quais observaram que o pH de doses inseminantes diluídas em BTS apresentam um aumento de pH (0,06) nas 82h e que esse aumento provavelmente se dá pelo fato do diluente perder CO₂ para o compartimento de ar presente na embalagem de armazenamento. Apesar das doses inseminantes desse estudo terem sido produzidas em Androstar Plus®, Menegat *et al.* (2017) e Menezes *et al.* (2020) observaram que o pH de doses produzidas no mesmo diluente aumenta ao longo do período de armazenamento, sendo mais elevado no momento 120h. Como no TTR as doses são incubadas na presença de ar no tubo, especula-se que o pH tenha aumentado ao longo do teste devido à perda de CO₂ para a atmosfera. Assim, esse aumento de pH das doses pode explicar, pelo menos em parte, a redução da motilidade espermática ao longo do TTR.

Além disso, Quirino *et al.* (2023) ao avaliar doses inseminantes com diferentes concentrações espermáticas (20×10^6 sptz/mL, 30×10^6 sptz/mL, 60×10^6 sptz/mL e 100×10^6 sptz/mL), produzidas em Androstar Plus® e armazenadas a 17°C, demonstram que doses que possuem um maior fator de diluição (20×10^6 sptz/mL, fator de diluição 22 partes de diluente:1 parte de sêmen), apresentam pH inicial maior (7,11) e aumento de pH (0,11) nas 120h de armazenamento, enquanto doses que possuem um menor fator de diluição (100×10^6 sptz/mL, 4 partes de diluente:1 parte de sêmen), apresentam pH inicial menor (7,00) e diminuição de pH (0,14) ao longo de 120h de armazenamento. Como no presente estudo as doses avaliadas tiveram concentração de $\sim 30 \times 10^6$ sptz/mL (fator de diluição = $\sim 14:1$), o aumento de pH observado nos 300 min pode ser parcialmente explicado pelo fato de haver uma maior quantidade de diluente disponível para as células, devido ao maior fator de diluição e, dessa

forma, o sistema tampão do diluente ser capaz de evitar o decaimento do pH ao longo do período de incubação.

6.4 Gravidade de aglutinações espermáticas nas doses de sêmen

A aglutinação espermática é um fenômeno bem conhecido para sêmen suíno (BOLLWEIN *et al.*, 2004). No entanto, estudos que avaliem a gravidade de aglutinações espermáticas ao longo do armazenamento são escassos e limitados a experimentos que avaliam somente possíveis causas das aglutinações, mas não o seu impacto na qualidade espermática e capacidade fecundante de doses inseminantes (ALTHOUSE *et al.*, 2000). Harayama *et al.* (1994) relataram que células espermáticas aglutinadas apresentam somente motilidade local. Além disso, Bollwein *et al.* (2004) classificaram os ejaculados de acordo com o grau de aglutinação, obtendo a classe baixa (<10% dos espermatozoides aglutinados), a classe média ($\geq 10\%$ a <20%) e a classe alta ($\geq 20\%$ dos espermatozoides aglutinados) e observaram que ejaculados de classe alta de aglutinação apresentam uma taxa 7,4% menor de células espermáticas com movimento progressivo, após a diluição, em comparação a ejaculados de classe baixa. Esse resultado corrobora com o achado deste estudo, uma vez que machos de classe Baixa apresentaram maior frequência de aglutinações de gravidade 3, enquanto machos com doses inseminantes da classe alta apresentaram menor gravidade de aglutinações. Além disso, no estudo de Bollwein *et al.* (2004), não houve correlação significativa entre aglutinação com pH do ejaculado, integridade de membrana plasmática e de acrossoma, e a presença de aglutinações no ejaculado. No presente estudo, apesar de ter sido observada uma correlação significativa, esta foi considerada fraca ($r_s = 0,21$; $P = 0,04$). Adicionalmente, houve correlação negativa moderada com a integridade de membrana plasmática ($r_s = -0,41$; $P < 0,01$), mas sem associação com integridade de membrana acrossomal ($P = 0,75$).

7 CONCLUSÃO

O TTR é um teste realizado para avaliação da capacidade fecundante das amostras. Apesar da motilidade espermática ter sido reduzida após 300 min, doses que já apresentavam baixa motilidade antes do teste, foram mais sensíveis, com redução mais drástica de qualidade (queda acentuada de motilidade e aumento da gravidade de aglutinações). Os motivos que levam à queda de motilidade ainda merecem futuras investigações, mas parecem estar associados com alterações do meio que levam ao aumento do pH e redução da integridade de membrana plasmática.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Relatório Anual 2022**. 2022. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/01/abpa-relatorio-anual-2022.pdf>.
- ALTHOUSE, G.C. *et al.* Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1167–1176, 2000.
- AX, R.L. *et al.* Semen Evaluation. *Em: REPRODUCTION IN FARM ANIMALS*. Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2016. p. 363–375. *E-book*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119265306.ch25>.
- BOE-HANSEN, Gry Brandt; SATAKE, Nana. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. **Theriogenology**, v. 137, p. 93–103, 2019.
- BOLLWEIN, H *et al.* The incidence of agglutination and its influence on sperm quality and fertility of boar semen. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 117, n. 7–8, p. 327–333, 2004.
- BONET, S. Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. **Animal Reproduction Science**, v. 22, n. 1, p. 67–80, 1990.
- BONET, S; BRIZ, MD; YESTE, M. A Proper Assessment of Boar Sperm Function May Not Only Require Conventional Analyses but Also Others Focused on Molecular Markers of Epididymal Maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 52–64, 2012.
- BORTOLOZZO, F P *et al.* Exame do Ejaculado. *Em: BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I (org.). Suinocultura em Ação – Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. 2005. p. 74–74.
- BORTOLOZZO, F P; WENTZ, I. Inseminação artificial em suínos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 13–15, 1997.
- BORTOLOZZO, F P; WENTZ, I; DALLANORA, D D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 17–17, 2018.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J. *et al.* Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility1. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 3, p. 779–789, 2012.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ªed. 2013. p. 87
- COLENBRANDER, B; FEITSMA, H; GROOTEN, H J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 48, p. 207–215, 1993.
- DE AMBROGI, M *et al.* Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 5, p. 543–552, 2006.

DIDION, B.A. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1374–1376, 2008.

ESTIENNE, M J; HARPER, A F; DAY, J L. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C. **Reproductive biology**, v. 7, n. 3, p. 221–231, 2007.

FISER, P.S. *et al.* New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 28, n. 5, p. 454–459, 1991.

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

FOXCROFT, G.R. *et al.* Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1324–1336, 2008.

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

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

GATTI, J-L. *et al.* External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 98, n. 2, p. 439–449, 1993.

HARAYAMA, H. *et al.* Identification of anti-agglutinin for spermatozoa in epididymal boar plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 4, p. 436–445, 1994.

JOHNSON, L.A *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, , v. 62, n. 1–3, p. 143–172, 2000.

JONES, Jeffrey M; BAVISTER, Barry D. Acidification of Intracellular pH in Bovine Spermatozoa Suppresses Motility and Extends Viable Life. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 616–624, 2000.

JUNG, M; RÜDIGER, K; SCHULZE, M. In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 20–24, 2015.

KARAGEORGIU, M A *et al.* A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. **Acta Veterinaria Brno**, v. 85, n. 1, p. 23–31, 2016.

LAMBERSON, W.R.; SAFRANSKI, T.J. A model for economic comparison of swine insemination programs. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 799–807, 2000.

LARSSON, K.; ERSMAR, M. Laboratory Studies on Frozen-Thawed Boar Semen in Relation to Contemporary Fertility with Liquid Semen of AI Boars. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 15, n. 2, p. 111–117, 1980.

MACÊDO, Iara Nóbrega *et al.* The interference of ozone gas in kinetics and mitochondrial potential of equine sperm submitted on cryopreservation. **Animal Reproduction**, v. 18, n. 4, 2021.

MELLAGI, A P *et al.* **Atualizações na avaliação andrológica em suínos Updates in breeding soundness evaluation in swine**, 2019.

MENEGAT, M B *et al.* 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 *et al.* Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in-vitro sperm quality and reduces bacterial load. **Theriogenology**, v. 149, p. 131–138, 2020.

PEZO, F *et al.* Preservation of boar semen: An update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 423–434, 2019.

PINART, E; PUIGMULÉ, M. Factors Affecting Boar Reproduction, Testis Function, and Sperm Quality. *Em: BOAR REPRODUCTION*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 109–202.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; RAMPACEK, G. B. Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa Incubated before Cold Shock1. **Journal of Animal Science**, v. 34, n. 2, p. 278–283, 1972.

QUIRINO, M *et al.* A 5-color flow cytometry panel to assess plasma membrane integrity, acrosomal status, membrane lipid organization and mitochondrial activity of boar and stallion spermatozoa following liquid semen storage. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p. 107076–107076, 2022a.

QUIRINO, M *et al.* Estimation of sperm concentration limits to produce intrauterine insemination doses in swine. **Reproduction in Domestic Animals**, 2023.

QUIRINO, M *et al.* Live cells are not affected by dead sperm in liquid boar semen: New insights based on a thermo-resistance test. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 11, p. 1327–1335, 2022b.

RIGAU, T. *et al.* The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 2–3, p. 161–172, 1996.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Heriberto *et al.* Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, , v. 63, n. 2, p. 514–535, 2005.

SCHMID, S. *et al.* The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa. **Andrology**, , v. 1, n. 3, p. 376–386, 2013.

SCHULZE, M. *et al.* Effect of vibration emissions during shipping of artificial insemination doses on boar semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 328–334, 2018.

SCHULZE, M. *et al.* Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 182, p. 138–145, 2017.

SCHULZE, M. *et al.* Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 127, p. 15–20, 2019.

SCHULZE, M. *et al.* Suitability of semen stress tests for predicting fertilizing capacity of boar ejaculates. **Theriogenology**, v. 176, p. 73–81, 2021.

SCHULZE, M; JUNG, M; HENSEL, B. Science-based quality control in boar semen production. **Molecular Reproduction and Development**, , 2022.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, , v. 65, n. 5, p. 958–978, 2006.

SUTKEVICIENE, N *et al.* Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 1, p. 53–53, 2009.

TALINI, R. *et al.* Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, , v. 71, n. 6, p. 2085–2092, 2019.

TARDIF, S. *et al.* The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, , v. 52, n. 3, p. 447–459, 1999.

TSAKMAKIDIS, I. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; KHALIFA, T. A. A. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. **Journal of Veterinary Science**, , v. 11, n. 2, p. 151–151, 2010.

VIANNA, W L *et al.* Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6 suppl 2, p. 2054–2059, 2004.

VYT, P *et al.* Air Contact Influences the pH of Extended Porcine Semen. **Reproduction in Domestic Animals** , v. 42, n. 2, p. 218–220, 2007.

WABERSKI, D *et al.* Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

WYSOKIŃSKA, A; SZABLICKA, D. Integrity of sperm cell membrane in the semen of crossbred and purebred boars during storage at 17°C: Heterosis effects. **Animals**, v. 11, n. 12, 2021.