

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

**“INFLUÊNCIA DA VIBRAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ENVASADAS EM
EMBALAGENS TIPO BAG OU TUBO”**

GABRIEL ANTÔNIO BONA

PORTO ALEGRE

2024

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

**“INFLUÊNCIA DA VIBRAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ENVASADAS EM
EMBALAGENS TIPO BAG OU TUBO”**

Autor: Gabriel Antônio Bona

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias na área Reprodução de Suínos.

Orientador: Prof. Dra. Ana Paula
Gonçalves Mellagi

Coorientador: Dr. Martin Schulze

PORTO ALEGRE

2024

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

CIP - Catalogação na Publicação

Bona, Gabriel Antônio
"INFLUÊNCIA DA VIBRAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DAS
CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ENVASADAS
EM EMBALAGENS TIPO BAG OU TUBO" / Gabriel Antônio
Bona. -- 2024.
63 f.
Orientadores: Ana Paula Gonçalves Mellagi, Martin
Schulze.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Inseminação Artificial. 2. Embalagens de Sêmen
Suíno. 3. Efeito do Transporte Sob Parâmetros
Espermáticos. I. Gonçalves Mellagi, Ana Paula, orient.
II. Schulze, Martin, orient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gabriel Antônio Bona

**“INFLUÊNCIA DA VIBRAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ENVASADAS EM
EMBALAGENS TIPO BAG OU TUBO”**

Aprovado em 21/03/2024

APROVADO POR:

Prof. Dra. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

Membro da Banca

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Membro da Banca

Prof. Dra. Mariana Groke Marques

Membro da Banca

Porto Alegre, 21 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

Com todo o meu coração, expesso profunda gratidão a Deus por guiar cada passo do meu caminho, por me conceder vida, saúde, alegria e carinho daqueles que me cercam. Nas pequenas e preciosas coisas da vida, encontro minha maior riqueza e reconheço que sou verdadeiramente abençoado pela Sua graça.

À minha amada família, sou imensamente grato por seu apoio incondicional, por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais desafiadores. Agradeço especialmente à minha esposa Lorena e à nossa querida Marina, cujo amor e inspiração me impulsionam a buscar minha melhor versão a cada dia.

Aos preciosos amigos e colegas que compartilharam comigo esta jornada, meu mais sincero agradecimento. Bernardo, Rodrigo, Marcelo, Lucas (o alemãozinho), Léo, Monike, Thaís, Nabila, e a todos os bolsistas de iniciação científica, também grandes amigos, vocês foram verdadeiros companheiros, enriquecendo direta ou indiretamente este trabalho com sua dedicação e amizade. Espero que eu tenha contribuído em algo para com as suas vidas, assim como vocês contribuíram para a minha.

Aos estimados professores Ana Paula, David, Fernando e Rafael, sou grato por compartilharem seu conhecimento e experiência, guiando-me com sabedoria ao longo deste percurso acadêmico. O Setor de Suínos, em particular, desempenhou um papel fundamental em minha formação profissional e pessoal, e por isso expesso minha mais sincera gratidão. Serei eternamente grato por me descobrir um amante das biotécnicas da reprodução, andrologia e reprodução de suínos.

Por fim, aos dedicados funcionários, Cida e o Seu Carlos, que cuidam de nós com tanto carinho e zelo, meu muito obrigado. Suas gentilezas não passaram despercebidas e foram fundamentais durante todo esse período.

“As we soar towards the heights of knowledge, I recall that each challenge face is a step that elevate us. May this academic journey, permeated by curiosity and passion, be only the prologue to a life dedicated to the relentless pursuit of wisdom.”

Autor desconhecido

RESUMO

Recentemente, foi demonstrado que as vibrações oriundas do transporte de doses de sêmen suíno comprometem a qualidade espermática, dependendo da intensidade e tempo de agitação. Apesar dos trabalhos até o momento terem sido realizados com embalagem tipo tubos flexíveis, há uma grande utilização de embalagens tipo bag. Assim, o objetivo do estudo foi comparar duas embalagens de doses (tipo Bag ou Tubo) de sêmen suíno, submetidos a diferentes tempos de agitação sobre os parâmetros espermáticos. Doses de 30 diferentes machos foram produzidas com $1,5 \times 10^9$ células em 45 mL em diluente BTS, e foram submetidas a 0, 6 e 12 h de agitação a 100 RPM. As doses foram armazenadas até 168 h de armazenamento e avaliadas quanto à motilidade, pH, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, apoptose, espécies reativas ao oxigênio (EROs) e teste de termoresistência (TTR). As análises foram realizadas como medidas repetidas, incluindo o tipo de embalagem, tempo de agitação, tempo de armazenamento (ou de incubação para o TTR), e suas interações. Observou-se redução da motilidade espermática total e progressiva, e aumento das EROs ($P < 0,01$) durante o armazenamento. Com o aumento do tempo de agitação, houve redução das motilidades espermáticas, aumento de pH, redução no percentual de células não apoptóticas, e com alta atividade mitocondrial, aumento de EROs, e menor resistência ao TTR ($P \leq 0,04$). As embalagens tipo Tubo apresentaram maior motilidade espermática durante o armazenamento e após o TTR, além de maior proporção de células não apoptóticas, e maior atividade mitocondrial do que Bag ($P < 0,01$). Houve interação entre tempo de armazenado e embalagem ($P < 0,01$), em que o pH das doses em Tubo foi superior ao Bag após 72 h de armazenamento, e com um aumento constante até às 168 h. Também foi observado uma interação embalagem \times tempo de agitação \times armazenamento para integridade de membrana plasmática ($P = 0,05$). Quando não agitadas ou com 6 h de agitação, as embalagens não diferiram às 72 e 120 h de armazenamento. No entanto, com 12 h de agitação e após 120 h de armazenamento, a integridade de membrana plasmática foi reduzida nas embalagens tipo Bag quando comparado aos Tubos ($P < 0,01$). A integridade acrossomal foi reduzida em ambas as embalagens com o aumento do tempo de agitação; no entanto a redução foi mais pronunciada nos Bags em comparação aos Tubos ($P < 0,05$). Em conclusão, este estudo demonstrou que grupo Tubo ofereceu uma proteção superior aos espermatozoides, principalmente sob condições de agitação prolongada.

Palavras-chave: inseminação artificial; embalagens de sêmen; cachaço; transporte.

ABSTRACT

Recent research has revealed that vibrations originating from the transportation of boar semen doses can compromise sperm quality, depending on the intensity and duration of agitation. Despite previous studies primarily focusing on flexible tube package, bag package is widely used. Therefore, the objective of this study was to compare two types of packages for semen dose (Bag or Tube) submitted to different agitation times regarding sperm parameters. Semen doses from 30 different boars were produced with 1.5×10^9 cells in 45 mL with BTS extender and submitted to agitation for 0, 6, and 12 h at 100 RPM. Semen doses were then stored for up to 168 h and evaluated for motility, pH, plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial potential, apoptosis, reactive oxygen species (ROS), and thermo-resistance test (TRT). Analyses were conducted as repeated measures, including package type, agitation time, storage time (or incubation for TRT), and their interactions. A decrease in total and progressive sperm motility and an increase in ROS ($P < 0.01$) were observed during storage. Longer agitation time resulted in reduced sperm motility, increased pH, decreased non-apoptotic cell percentage, elevated mitochondrial activity, increased ROS, and decreased the TRT results ($P \leq 0.04$). Tube package exhibited higher sperm motility during storage and after TRT, as well as a higher proportion of non-apoptotic cells and cells with high mitochondrial activity than Bag ($P < 0.01$). There was a significant interaction between storage time and package ($P < 0.01$), with Tube doses showing higher pH levels after 72 h, consistently increasing up to 168 h. Additionally, there was a three-way interaction between package, agitation time, and storage for plasma membrane integrity ($P = 0.05$). While there were no differences between package types at 72 and 120 hours when non-agitated or submitted to 6 h of agitation, plasma membrane integrity was significantly reduced in Bag package compared to Tubes after 12 h of agitation and 120 h of storage ($P < 0.01$). Acrosomal integrity decreased with increased agitation time, particularly pronounced in Bags compared to Tubes ($P < 0.05$). In conclusion, this study highlights the superior protection offered by Tube package, especially under prolonged agitation conditions.

Keywords: artificial insemination; semen packages; boar; transport.

LISTA DE ABREVIACOES E ACRONIMOS

AI	Artificial Insemination
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CPS	Central Produtora de Semen
DCFH	Dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein diacetate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
IA	Inseminação Artificial
IAU	Inseminação Artificial Intrauterina
PI	Propidium Iodide
pH	Potential of hydrogen
PNA	Peanut Agglutinin
RFU	Relative Fluorescence Units
ROS	Reactive Oxygen Species
TMRE	Tetramethylrhodamine ethyl ester
TRT	Thermo-resistance test
TTR	Teste de termo-resistencia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Avaliações <i>in vitro</i> de parâmetros espermáticos das doses inseminantes	13
2.1.1	Motilidades espermáticas total e progressiva.....	13
2.1.2	Teste de termorresistência.....	14
2.1.3	Número de células espermáticas nas doses de sêmen	15
2.1.4	Análise de pH.....	16
2.1.5	Integridade de estruturas espermáticas.....	17
2.1.6	Apoptose celular.....	19
2.1.7	Potencial mitocondrial.....	20
2.1.8	Produção de espécies reativas de oxigênio.....	21
2.2	Tipos de embalagem para envase de doses inseminantes	22
2.2.1	Embalagens tipo Bag.....	23
2.2.2	Embalagens tipo Tubo.....	24
2.3	Transporte de doses inseminantes	25
3	OBJETIVO.....	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura contemporânea passou por transformações significativas impulsionadas por inovações tecnológicas e avanços genéticos. Entre as principais biotecnologias disponíveis na suinocultura, destaca-se a inseminação artificial, amplamente utilizada e eficaz, evidenciada pela constante atualização e complementação com técnicas que visam aumentar ainda mais a produtividade (Knox, 2016). Na última década, a inseminação artificial (IA) tem sido responsável por cerca de 90 a 100% das coberturas em muitos dos principais países produtores de carne suína, destacando-se como uma prática essencial para otimizar a produtividade e a eficiência reprodutiva (Waberski et al., 2019). Seu sucesso tem sido associado principalmente à qualidade da dose de sêmen (Bortolozzo et al., 2015; Knox, 2016).

Entretanto, assegurar a qualidade das doses inseminantes apresenta desafios significativos, especialmente em contextos menos profissionalizados. A centralização e profissionalização das centrais produtoras de sêmen (CPS) são fundamentais para manter rigorosos padrões de qualidade e renovação genética nos plantéis, minimizando riscos como a contaminação bacteriana e garantindo a integridade do produto (Schulze et al., 2019). Com a centralização das operações, o transporte de doses inseminantes tornou-se uma prática comum na suinocultura, com distâncias que variam de 5 a 1500 km entre as CPS e as granjas, percorridas em até 12 horas ou mais (Hafemeister et al., 2022).

Fatores como a intensidade de vibração durante o transporte (Schulze et al., 2018), temperatura de transporte (Paschoal et al., 2021) e a relação entre o tipo de diluente utilizado e a duração do transporte (Tamanini et al., 2022) foram estudados para determinar seus efeitos sobre a qualidade espermática. Mais recentemente, Hafemeister et al. (2023) conduziram um estudo investigando a interação entre a intensidade das vibrações e a duração do transporte como fatores que influenciam a qualidade do sêmen, constatando que há redução nos parâmetros espermáticos de acordo com o aumento da intensidade das vibrações e da duração do transporte, sendo esse efeito ampliado com o aumento do tempo de armazenamento. No entanto, pouco se sabe sobre como diferentes tipos de embalagens disponíveis para o envase das doses afetam a qualidade dos espermatozoides durante o transporte.

Até o momento presente, não foram realizados estudos que avaliem a qualidade das células espermáticas de doses inseminantes envasadas em embalagens tipo Bag, nem mesmo que comparem os diferentes tipos de embalagem ou que correlacionem o efeito das vibrações decorrentes do transporte sobre elas. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de diferentes tempos de agitação na qualidade de doses de sêmen suíno envasadas nos dois

principais tipos de embalagens utilizadas pelas CPS, as embalagens tipo Bag ou Tubo, uma vez que essas possuem formato, capacidade volumétrica, área de contato, curva de resfriamento, material e espessuras diferentes. Os resultados obtidos poderão auxiliar na determinação da embalagem ideal para envasar as doses de sêmen que serão submetidas à diferentes durações de transporte e na adoção de possíveis práticas que permita reduzir a emissão de vibrações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A reprodução de suínos em granjas tecnificadas é conduzida, principalmente, através da inseminação artificial (IA) com o uso de sêmen diluído e envasado em estado líquido. É essencial garantir que os parâmetros espermáticos atendam ou superem os padrões estabelecidos, considerando que impactos negativos na motilidade, morfologia ou integridade da membrana plasmática dos espermatozoides podem estar associados a taxas reduzidas de parto e ao decréscimo no tamanho das leitegadas.

A IA na suinocultura representa uma inovação de grande impacto, transformando a maneira como a reprodução de suínos é realizada em escala mundial. Essa técnica se tornou um pilar fundamental para o avanço do desempenho reprodutivo na suinocultura moderna, permitindo avanços notáveis na eficiência reprodutiva através da utilização de machos geneticamente superiores e otimizando a inseminação de fêmeas (Knox, 2016). Essa prática contribui para a elevação dos índices de produtividade e redução dos custos de produção (Matos *et al.*, 2008). A predominância do uso de sêmen diluído e refrigerado consolida a IA como a biotécnica de reprodução mais utilizada dentre os maiores países produtores de suínos, podendo corresponder a até 90% das práticas de reprodução (Waberski *et al.*, 2019).

A obtenção de doses adequadas para a inseminação requer um monitoramento rigoroso do controle de qualidade em todas as etapas de produção e processamento de sêmen. Nas CPS, análises iniciais do ejaculado são cruciais, incluindo a avaliação da concentração, motilidade e morfologia espermática. Essas análises compõem a avaliação da capacidade de fertilidade do macho suíno, garantindo que apenas os melhores ejaculados sejam utilizados (Tsakmakidis, Lymberopoulos, Khalifa, 2010). No entanto, algumas alterações da funcionalidade espermática são visualizadas com a avaliação das doses de sêmen armazenadas.

2.1 Avaliações *in vitro* de parâmetros espermáticos das doses inseminantes

2.1.1 Motilidades espermáticas total e progressiva

A motilidade espermática é um parâmetro essencial para o monitoramento rotineiro da qualidade seminal nos laboratórios das CPS. As verificações regulares após a diluição e durante o armazenamento fornecem informações valiosas sobre a viabilidade e a capacidade de preservação das características individuais de cada reprodutor.

A mensuração das motilidades pode ser realizada por meio de microscopia óptica ou utilizando o método mais robusto e prático de análise computadorizada de sêmen (CASA – *Computer-Assisted Sperm Analysis*) (Broekhuijse *et al.*, 2011). Embora a microscopia de fase possa ser subjetiva e suscetível a variações, ela é uma prática que demanda baixo investimento (Passarelli *et al.*, 2020). Por outro lado, o sistema CASA, introduzido na década de 1980 e aperfeiçoado ao longo dos anos, proporciona resultados mais precisos e objetivos, permitindo a avaliação de parâmetros cinemáticos específicos e a identificação de subpopulações espermáticas, além de outros tipos de avaliação das células espermáticas (Amann e Katz, 2004; Boe-Hansen; Satake, 2019; Estrada *et al.*, 2017; Yeste *et al.*, 2018).

A correlação entre motilidade espermática e fertilidade é um campo extensivamente explorado dentro da suinocultura. Embora a motilidade no ejaculado explique apenas uma fração da variação observada na fertilidade, cerca de 4% (Broekhuijse *et al.*, 2011), a motilidade do sêmen diluído e armazenado por até sete dias exerce uma influência mais direta sobre o tamanho da leitegada (Juonala' *et al.*, 1998), assim, a análise em doses inseminantes diluídas pode auxiliar na seleção de machos mais férteis (Lucca *et al.*, 2021). Outros fatores como temperatura de diluição (Schulze *et al.*, 2013), temperatura de armazenamento (Althouse *et al.*, 1998) e a homogeneização periódica das doses durante o armazenamento (Schulze; Rüdiger; Waberski, 2015) também podem afetar a motilidade espermática.

2.1.2 Teste de termorresistência

A fertilização é um processo complexo e que envolve uma série de eventos, e ao longo dos anos, tem-se observado avanços significativos no desenvolvimento de tecnologias para avaliar a funcionalidade dos espermatozoides e a fertilidade *in vitro* (Gadea, 2005). Nesse contexto, o teste de termorresistência (TTR) se estabelece como uma ferramenta fundamental na análise da capacidade de resistência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea. Este teste submete os espermatozoides a condições que simulam a temperatura corporal interna da fêmea suína, mantendo-os expostos à 38°C por um período prolongado (Tardif *et al.*, 1999), seguido da avaliação de seus parâmetros espermáticos após 30 e 300 minutos de incubação (Schulze *et al.*, 2019). Essa ferramenta destaca danos que podem não ser imediatamente evidentes após a ejaculação ou processamento do sêmen (Fiser *et al.*, 1991).

Estudos recentes indicam que características específicas da cinemática espermática, avaliadas após a submissão ao TTR e analisadas por meio do sistema CASA, têm o potencial de prever a fertilidade de reprodutores suínos (Schulze *et al.*, 2019). Esta metodologia não

apenas fornece informações relevantes sobre os reprodutores, como também se destaca por ser um procedimento de fácil execução, possibilitando a identificação e descarte de machos que não resistentes ao TTR. Dessa forma, a implementação do TTR, aliada à análise através do sistema CASA, destaca-se como uma estratégia valiosa na gestão da qualidade de machos que disseminarão genes através de doses inseminantes e na otimização da eficiência reprodutiva dos plantéis.

2.1.3 Número de células espermáticas nas doses de sêmen

A avaliação da concentração de espermatozoides é um passo fundamental no processo de produção de doses de sêmen para IA. A precisão na determinação da concentração é importante para otimizar a taxa de diluição e garantir o número adequado de espermatozoides por dose. Diversos métodos são empregados para essa finalidade, variando entre as CPS, como câmaras hemocitométricas, espectrofotômetros, espermiométrico de Karras, sistema CASA (Bortolozzo *et al.*, 2005) e, mais atualmente, Nucleocounter. Com a constante de redução do número de células espermáticas usadas atualmente, independente da técnica de IA empregada, as CPS vêm utilizando técnicas precisas para garantir o número de células padronizado entre as doses produzidas pela CPS. Nesse sentido, a taxa de diluição das doses, que corresponde à proporção entre o volume de diluente e o volume de ejaculado (v/v), torna-se um ponto importante durante o processamento (Schulze e Rüdiger, 2014). Apesar do constante esforço para reduzir o número de células espermáticas por doses, algumas CPS aumentam o número total de espermatozoides das doses e, conseqüentemente, a concentração para compensar problemas morfológicos ou de imotilidade dos espermatozoides (Broekhuijse *et al.*, 2012; Waberski *et al.*, 2019).

Considerando as variações na concentração de espermatozoides e no volume utilizado em diferentes regiões do mundo, observamos uma disparidade significativa. Enquanto algumas centrais na Europa têm produzido doses para IAC com 1,8 ou até 1,5 bilhão de células em ~ 90 mL ($18 - 16 \times 10^6$ células/mL) (Waberski *et al.*, 2019), as doses utilizadas para IAIU produzidas na América do Sul apresentam ~ 1,5 bilhão de células em 50 mL de volume total ($\sim 30 \times 10^6$ células/mL) (Bortolozzo *et al.*, 2015). É importante destacar que doses com baixa concentração podem ter sua qualidade prejudicada devido a alterações metabólicas no meio ou à diluição de compostos importantes no plasma seminal (Flowers, 1997; Weitze *et al.* 2011). Quirino *et al.* (2023) realizaram um estudo avaliando o efeito da concentração de espermatozoides para inseminação artificial intrauterina (IAIU), onde doses

com diferentes concentrações variando de 20 a 100×10^6 células/mL em um volume final de 50 mL foram analisadas quanto à qualidade espermática. Os resultados indicaram que variação na concentração de espermatozoides das doses de sêmen prejudica a qualidade da dose, uma vez que doses contendo 30×10^6 células/mL apresentaram maior motilidade em comparação com doses de concentração inferior (20×10^6 células/mL), uma vez que diluições elevadas podem causar choque osmótico (Flowers, 1997) ou resultar em uma redução proporcional nos componentes protetores do plasma seminal (Weitze *et al.*, 2011). Doses com concentração superior (60×10^6 células/mL), visando compensar ejaculados com baixa motilidade, por exemplo, têm sua qualidade prejudicada muito provavelmente pela quantidade insuficiente de substrato energético (Flowers, 1997) ou a uma proporção menor de substâncias tampão, uma vez que a quantidade de ácido lático produzido é proporcional à concentração espermática (Marcos *et al.*, 1991).

2.1.4 Análise de pH

Os espermatozoides se destacam como as únicas células que desempenham suas funções fora do corpo do macho. No ambiente químico e fisiologicamente instável do ejaculado, o potencial hidrogeniônico (pH) é um dos fatores mais críticos que determinam a qualidade do sêmen após diluição. Todos os processos biofisiológicos nas células, que envolvem enzimas, hormônios e transmissores, são dependentes do pH. Ressaltando a importância desse parâmetro para a atividade e estabilidade celular (Casey; Grinstein; Orłowski, 2010). Os espermatozoides são particularmente sensíveis às variações de pH, e funções como motilidade, viabilidade, capacitação e reação acrossômica são diretamente influenciadas por esse fator (Zhou *et al.*, 2015).

A regulação do pH dos espermatozoides é mediada por meio de três mecanismos principais: o influxo de HCO_3^- , que envolve o movimento interno de HCO_3^- , sendo essencial para a capacitação dos espermatozoides (Chen *et al.*, 2009); o canal de prótons sensível à voltagem Hv1, que transporta H^+ através da membrana e é composto por um domínio de sensor de voltagem homólogo ao sensor de voltagem de canais catiônicos sensíveis à voltagem (Takeshita *et al.*, 2014); e através das transferência de prótons através do trocador NA^+/H^+ (NHE) (Wang *et al.*, 2007). Esses mecanismos, avaliados por meio de ferramentas moleculares, farmacológicas e eletrofisiológicas em diversos estudos, sugerem a operação independente desses sistemas nos espermatozoides, cada um sendo regulado por diferentes mecanismos.

O pH intracelular dos espermatozoides está diretamente relacionado ao pH do meio em que se encontra, participando da regulação iônica ao longo da membrana espermática (Gatti *et al.*, 1998). Além disso, o pH regula a abertura dos canais iônicos de cálcio (CatSper) presentes na cauda dos espermatozoides, diretamente relacionados à processos como hiperativação do espermatozoide, capacitação e reação acrossômica (Correia; Michelangeli; Publicover, 2015; Ellinger, 2016).

Imediatamente após a ejaculação, o sêmen suíno apresenta um pH aproximado de $7,4 \pm 0,2$ (Johnson *et al.*, 2000). Alguns autores consideram valores entre 7,3 e 7,9 como normais (Hafez, 1993; Ax *et al.*, 2016). Valores abaixo ou acima desse intervalo podem comprometer a motilidade e o metabolismo dos espermatozoides (Johnson *et al.*, 2000). Tanto a alcalinização quanto a acidificação do pH podem ter consequências negativas e comprometer a qualidade das doses produzidas. Durante o processo de coleta, análise, diluição e envase das doses de sêmen, o pH pode ser afetado por fatores como contaminação bacteriana e atividade metabólica celular (Goldberg *et al.*, 2017), resultante da produção de ácido lático durante o metabolismo das bactérias. Quando esse pH é reduzido, tanto o metabolismo quanto a motilidade dos espermatozoides são reduzidos. Seu metabolismo glicolítico (a glicose é o principal carboidrato) leva a uma redução do pH intracelular e, conseqüentemente, o metabolismo celular é suprimido (Rigau *et al.*, 1996). Por outro lado, o aumento do pH pode estar relacionado à perda de CO₂ para o ambiente e está diretamente relacionado à quantidade de ar residual presente no interior das embalagens em que as doses estão envasadas (Vyt *et al.*, 2007). O incremento do pH durante o período de armazenamento das doses pode estar correlacionado com a diminuição da qualidade ou viabilidade dos espermatozoides. Em resumo, espermatozoides com alta motilidade inicial aumentam o consumo de energia, acelerando o metabolismo e a produção de CO₂. Se esse CO₂ não é retido no sêmen, ele não contribui para a formação de ácido carbônico, resultando em um aumento do pH. Isso pode levar a um ambiente menos ideal para a preservação da viabilidade espermática, contribuindo para a fadiga espermática e a diminuição da qualidade dos espermatozoides (Jones; Bavister, 2000).

2.1.5 Integridade de estruturas espermáticas

A morfologia das estruturas dos espermatozoides é um importante indicador da fertilidade dos reprodutores suínos, sendo essencial na produção e avaliação de doses inseminantes. O controle rigoroso da qualidade do sêmen é fundamental para assegurar o

sucesso reprodutivo, uma vez que um alto percentual de células espermáticas defeituosas pode afetar negativamente as taxas de prenhez e o tamanho da leitegada (Tsakmakidis; Lymberopoulos; Khalifa, 2010). Assim, no controle de qualidade das CPS, tanto os ejaculados quanto as doses de sêmen devem ser avaliados quanto à morfologia espermática. Ejaculados e/ou machos podem ser descartados se apresentarem altos índices de defeitos morfológicos.

Em ejaculados de qualidade, sob situações não patológicas, espera-se que no mínimo 80% dos espermatozoides sejam normais e que no máximo 20% apresentem defeitos morfológicos (Rodríguez *et al.*, 2013). Defeitos específicos, como na cabeça, acrossoma, colo, peça intermediária, gota citoplasmática e defeitos na cauda, devem ser limitados a no máximo 10% (CBRA, 2013). Variações morfológicas são observadas entre raças e indivíduos, e diferentes porções do ejaculado podem apresentar características distintas em termos de composição e qualidade (Peña *et al.*, 2005; Saravia *et al.*, 2007). Uma alta proporção de células anormais está relacionada à menor capacidade de ligação ao epitélio do oviduto (Petrunkina *et al.*, 2001) e ao número de nascidos vivos (McPherson; Nielsen; Chenoweth, 2014).

As alterações espermáticas podem ser classificadas como primárias, secundárias ou terciárias, dependendo de sua origem (Bonet *et al.*, 2014). Alterações primárias são provenientes dos testículos durante o processo de espermatogênese; alterações secundárias através dos epidídimos durante a maturação espermática e, as terciárias, fornecem dados importantes sobre a manipulação do sêmen durante a coleta e processamento do ejaculado para a produção e armazenamento das doses inseminantes (Bonet *et al.*, 2014). Neste sentido, a avaliação da integridade do acrossoma fornece informações do reprodutor, mas também do processamento e das condições de armazenamento das doses (Johnson *et al.*, 2000). Alterações como degeneração ou danos ao acrossoma podem comprometer a capacidade fecundante dos espermatozoides.

Outra estrutura importante é a membrana plasmática. Os espermatozoides dos suínos, possuem membrana plasmática rica em ácidos graxos poli-insaturados e com baixo teor de colesterol, o que os torna particularmente vulneráveis a danos e choque térmico quando comparados com espermatozoides de outras espécies (Casas; Flores, 2013). Durante o armazenamento, as doses inseminantes podem sofrer alterações na organização de lipídios e proteínas decorrentes do aumento da permeabilidade a marcadores (corantes) e liberação de substâncias intracelulares, afetando a permeabilidade da membrana (Johnson *et al.*, 2000). A

perda de carga líquida pode indicar um processo de envelhecimento da célula espermática causado por peroxidação lipídica devido ao dano das fases lipídicas da membrana. Esses processos são regulados pela ação protetora dos antioxidantes seminais superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Johnson *et al.*, 2000). A preservação da integridade da membrana plasmática é essencial para a função espermática e serve como um indicador preditivo da fertilidade (Yeste *et al.*, 2010).

2.1.6 Apoptose celular

A apoptose celular, um processo natural de morte celular programada, manifesta-se em todos os tecidos do organismo, inclusive nas células espermáticas, desempenhando um papel na manutenção da homeostase celular e na eliminação de células danificadas ou disfuncionais. Este fenômeno biológico, regulado por uma complexa rede de sinais intracelulares, pode ser desencadeado tanto por mecanismos fisiológicos intrínsecos, quanto por fatores externos adversos, influenciando de maneira significativa a qualidade e a fertilidade dos machos reprodutores (Kerr; Wyllie; Curriet, 1972; Wyllie, 1980).

Embora a apoptose remova células espermáticas defeituosas, sua desregulação, induzida, por exemplo, por estresse oxidativo e condições ambientais adversas pode comprometer a integridade e a funcionalidade do espermatozoide. Essa desregulação pode afetar negativamente a qualidade da dose inseminante e, conseqüentemente, o sucesso da inseminação artificial.

Diversos estudos têm demonstrado a relevância da detecção de alterações apoptóticas em espermatozoides como critério para avaliação da qualidade seminal de machos reprodutores (Chen *et al.*, 2006). Fenômenos apoptóticos, inclusive em espermatozoides já maduros, como a translocação da fosfatidilserina (Peña *et al.*, 2005), têm sido observados e correlacionados com a infertilidade. De fato, sêmen oriundo de machos inférteis frequentemente, mas não invariavelmente, apresenta uma alta proporção de espermatozoides exibindo sinais típicos de apoptose, incluindo danos morfológicos, fragmentação do DNA nuclear e perda da distribuição assimétrica de fosfatidilserina na membrana plasmática (Barroso; Morshedi, 2000). Ademais, a expressão de proteínas pró-apoptóticas e a fragmentação do DNA espermático têm sido associadas a comprometimentos na motilidade dos espermatozoides, na capacidade de fertilização e no desenvolvimento embrionário subsequente (Aitken, 2017; Sakkas *et al.*, 2000).

2.1.7 Potencial mitocondrial

Estudos recentes em fisiologia espermática têm destacado a importância das mitocôndrias, estruturas celulares vitais responsáveis pela geração de energia e consideradas biomarcadores significativos para avaliar a saúde e a fertilidade dos espermatozoides (Darr *et al.*, 2016; Losano *et al.*, 2017). Localizadas na peça intermediária do espermatozoide, as mitocôndrias fornecem energia diretamente ao flagelo, essencial para a movimentação do espermatozoide (Ribeiro; Guerra, 2008) e regulam funções como homeostase de cálcio e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Moraes; Meyers, 2018). Além de sua função bioenergética, as mitocôndrias possuem seu próprio genoma, o que abre caminho para estudos do DNA mitocondrial, visando identificar possíveis causas de disfunção espermática e contribuir para uma compreensão mais aprofundada da fertilidade do macho (Malik; Czajka, 2013; May-Panloup *et al.*, 2003).

Ultraestruturalmente, as mitocôndrias são definidas por duas membranas distintas: uma membrana mitocondrial externa e outra interna. Essas estruturas são vitais para a produção de energia através da fosforilação oxidativa e para o controle do transporte de íons e metabólitos (Nicholls e Ferguson, 2013). A variação no potencial de membrana mitocondrial impacta diretamente a capacidade da célula de atender às demandas energéticas, tanto na despolarização, que indica dano mitocondrial, quanto na hiperpolarização, que pode aumentar a produção de EROS e causar danos celulares, refletindo diretamente na capacidade da célula de atender às demandas energéticas (Wolken; Arriaga, 2014).

A motilidade dos espermatozoides, um indicador chave da qualidade espermática, está intrinsecamente ligada à disponibilidade de adenosina trifosfato (ATP) produzido pelas mitocôndrias. Qualquer comprometimento nas funções mitocondriais pode resultar em deficiências na produção de ATP, afetando negativamente a velocidade e a progressão do movimento dos espermatozoides (Gravance' *et al.*, 1999). O potencial de membrana mitocondrial, portanto, é um indicador vital da capacidade das mitocôndrias em sustentar um gradiente eletroquímico, envolvendo a transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas e gerando energia livre por meio do transporte de elétrons (Angrimani *et al.*, 2015; Reers; Smith; Chens, 1991).

Para avaliar o status mitocondrial dos espermatozoides, pode-se utilizar sonda lipofílica como a tetrameti-rodamina etiléster (TMRE). A TMRE se acumula seletivamente nas mitocôndrias com alto potencial de membrana, emitindo fluorescência quando excitada.

Nesse caso, a detecção por citometria de fluxo de uma intensidade de fluorescência acima de determinado limiar (acima de 10^4) indica a presença de células com alto potencial mitocondrial. Além disso, o consumo de oxigênio mitocondrial emerge como um parâmetro central na avaliação da função mitocondrial, servindo como um importante ponto de referência biológico para o estado mitocondrial dos espermatozoides. Essa abordagem permite a identificação e quantificação de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial adequado, correlacionando-se diretamente com a viabilidade mitocondrial e associando-se ao potencial de fertilidade (Marchetti *et al.*, 2004).

2.1.8 Produção de espécies reativas de oxigênio

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes intrínsecas do sistema biológico, resultando em danos celulares e, por fim, morte celular (Betteridge, 2000 apud Galić *et al.*, 2022). As EROS, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são subprodutos naturais do metabolismo celular, sendo particularmente proeminentes nas mitocôndrias durante o processo de produção de energia (Guthrie; Welch, 2012).

Nos espermatozoides suínos, as EROS desempenham um papel fundamental em processos fisiológicos, como a capacitação, a reação acrossômica e a fertilização, quando presentes em níveis controlados (Kumaresan *et al.*, 2009). Alterações moderadas nos níveis intracelulares de EROS podem influenciar a atividade de quinases e fosfatases envolvidas na capacitação espermática, enquanto alterações nas ligações dissulfeto das proteínas e elevação nos níveis intracelulares de EROS podem afetar a descondensação dos pronúcleos após a fertilização (Betarelli *et al.*, 2018).

A membrana plasmática dos espermatozoides suínos, rica em ácidos graxos poli-insaturados, é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2015). O sistema antioxidante endógeno dos espermatozoides é limitado, tornando-os susceptíveis a danos irreversíveis na membrana, o que pode resultar em perda de motilidade (Zhu *et al.*, 2019).

Durante a preservação do sêmen suínos diluído, é essencial controlar o dano oxidativo aos espermatozoides. Enzimas antioxidantes essenciais, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase, são fundamentais para neutralizar as EROS e proteger os espermatozoides contra o estresse oxidativo. Além das enzimas antioxidantes, o plasma seminal também desempenha papel vital na defesa contra o estresse

oxidativo, contendo uma variedade de antioxidantes, incluindo vitamina C, vitamina E, glutatona e enzimas antioxidantes (Aitken, 1995).

Métodos analíticos *in vitro* são utilizados para determinar alterações relacionadas ao estresse oxidativo nos espermatozoides. Sondas fluorogênicas, como o 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA), são comumente utilizadas para medir a produção intracelular de EROS devido à sua natureza não tóxica, facilidade de uso, custo acessível e compatibilidade com equipamentos laboratórios básicos (de Haan *et al.*, 2022; Kalyanaraman *et al.*, 2012; Wardman, 2007). A fluorescência resultante do produto oxidado (DCF) é medida e utilizada como indicação indireta de EROS nos espermatozoides. Consequentemente, a intensidade da fluorescência de DCF é diretamente proporcional à extensão do estresse oxidativo intracelular por EROS (Khosravi *et al.*, 2014).

2.2 Tipos de embalagem para envase de doses inseminantes

Para garantir o armazenamento e transporte adequados do sêmen diluído da CPS até as granjas, é necessário que cada dose inseminante seja armazenada em embalagem própria para este uso até a realização da inseminação artificial. O processo de envase pode ser executado de forma automática ou manual, a depender do grau de automação da CPS. Os sistemas automatizados, por sua vez, conferem maior eficiência e precisão à operação, minimizando o desperdício e a manipulação excessiva do ejaculado.

Diversos tipos de embalagens estão disponíveis no mercado, incluindo garrafas plásticas, tubos e bags, cada um apresentando diferentes formatos e capacidades volumétricas. Estudos indicam que o tipo de embalagem influencia a taxa de resfriamento das doses, uma vez que diferentes embalagens podem levar tempos distintos para atingir a temperatura de conservação (Willenburg *et al.*, 2011). Além disso, as embalagens devem atender a requisitos específicos, como serem atóxicos em relação à capacidade de fertilização dos espermatozoides, estarem em conformidade com diversas regulamentações, passarem por rigorosos controles de qualidade e, não menos importante, possuírem design adequado para facilitar o resfriamento após envase e operacionalidade no momento do uso. Cabe aos fabricantes das embalagens a responsabilidade de garantir toda a certificação, realização de testes e comprovação da inatividade biológica, além de assegurar a não toxicidade em relação aos espermatozoides.

O sêmen proveniente dos machos reprodutores passa por um processo específico, onde após coletado e diluído, são envasados, principalmente, em embalagens do tipo bag ou tubo.

Essas doses podem permanecer armazenadas por períodos que variam entre 24 horas a até 1 semana. Durante esse intervalo, compostos presentes nas embalagens podem migrar para o sêmen, afetando diretamente a funcionalidade dos espermatozoides (Nerin *et al.*, 2014). É importante ressaltar que as células espermáticas são altamente sensíveis a qualquer composto presente no meio, sendo inclusive utilizadas como biossensores para detecção de substâncias tóxicas (Andersson *et al.*, 2010).

2.2.1 Embalagens tipo Bag

As embalagens tipo bag (Figura 1) são projetadas com múltiplas camadas plásticas para combinar propriedades físicas específicas para os espermatozoides. Alguns fabricantes utilizam estrutura de três a quatro camadas plásticas com pelo menos uma camada adesiva para mantê-las unidas, porém, hoje já existem embalagens totalmente livre de qualquer tipo de adesivo, que foram identificados como prejudiciais à viabilidade das células espermáticas. As camadas adesivas são separadas do sêmen diluído por camadas denominadas “suporte”. Essas camadas sofrem variações tecnicamente inevitáveis na espessura quando fabricadas e uma redução significativa na espessura dessas camadas pode aumentar o risco de toxinas da camada adesiva migrarem para a dose inseminante, conforme descrito por Nerin *et al.* (2014).

Atualmente, as embalagens bag são feitas de PET (polietileno tereftalato) e PE (polietileno), escolhidos por serem livres de contaminantes nocivos, como metais pesados, plastificantes e substâncias potencialmente desreguladora da atividade endócrina como Bisfenol A, Ftalatos e Adipatos (Grossfeld; Braun; Esch, 2020). Essas embalagens estão disponíveis em volumes que geralmente comportam 60 ou 90 mL de dose inseminante e são projetadas para serem envasadas exclusivamente por máquinas especializadas.

Figura 1 – Embalagens tipo Bag de diferentes marcas.



Fontes: <https://www.minitube.com/catalog/pt/quicktip-bag-bolsa-para-semen-porcino-p4700/>;

<https://magapor.com/en/portfolio-items/semembag-blisters/>

2.2.2 Embalagens tipo Tubo

As embalagens tipo tubo representam uma das primeiras tecnologias disponíveis para armazenar sêmen suíno diluído (Figura 2). Estes tubos são fabricados a partir de polietileno de baixa densidade (PEBD).

Essas embalagens possuem capacidades para 60 ou 95 mL, e oferecem flexibilidade para diferentes volumes de doses inseminantes. A variedade de cores disponíveis facilita a organização e dispensa a necessidade do uso de corantes, que podem auxiliar na divisão operacional das atividades das centrais, embora não influencie as propriedades do material da embalagem ou da integridade das amostras de sêmen. Além disso, a capacidade de serem envasadas e seladas tanto manual quanto automaticamente, oferece flexibilidade e compatibilidade com diversos graus de automação (Esch, 2023).

Figura 2 – Embalagens tipo Tubo de diferentes marcas.



Fontes: <https://www.minitube.com/catalog/en/quicktup-boar-semen-tube-95-ml-p1442/>;

<https://www.ratoai.com/semen-soft-tube-product/>

2.3 Transporte de doses inseminantes

A crescente centralização e profissionalização das CPS têm impulsionado a indústria suína a enfrentar desafios logísticos significativos, especialmente no que diz respeito ao transporte de doses inseminantes. No Brasil, um país com dimensões continentais e uma indústria suína robusta, onde as distâncias são um verdadeiro desafio logístico, o transporte de doses inseminantes é uma operação logística complexa, com cerca de 58% das doses sendo transportadas por rodovias em veículos equipados com sistemas de controle de temperatura, mantendo-as entre 15-18 °C, e 22,5% em caixas de isopor sem monitoramento de temperatura, e a distância percorrida entre as CPS e as granjas pode exceder 600 km, conforme descrito por Benneman *et al.* (2020) e que representa um risco potencial à viabilidade espermática devido às variações ambientais inerentes ao transporte (Schulze *et al.*, 2018). O transporte de doses inseminantes de suínos às granjas é uma etapa que requer atenção à fatores como a variação de temperatura e a emissão de vibrações, que podem afetar

a qualidade das doses inseminantes. Flutuações maiores que 2-3°C podem diminuir o tempo de armazenamento e viabilidade espermática (Paschoal *et al.*, 2021).

O estudo de Schulze *et al.* (2018) representou um avanço significativo na compreensão dos efeitos do transporte sobre a qualidade do sêmen. O desenvolvimento de um aplicativo para monitoramento em tempo real das vibrações durante o transporte permitiu uma avaliação detalhada dos impactos dessas forças mecânicas nas células espermáticas. O estudo simulou diferentes condições de transporte, comparando doses inseminantes que não foram submetidas a vibrações com aquelas que foram agitadas em um agitador orbital a 100 RPM e 300 RPM, representando condições de transporte com impacto variável, onde 300 RPM corresponde ao transporte em estrada de chão batido. A pesquisa revelou que vibrações intensas, que simulam condições adversas de rodovias, podem comprometer a motilidade espermática, o potencial mitocondrial e a integridade de acrossoma e de membrana plasmática. Além disso, essas doses também apresentaram uma redução na resistência ao TTR, fatores essenciais para a fertilização bem-sucedida. A pesquisa de Schulze *et al.* (2018) destacou a necessidade de minimizar as vibrações durante o transporte para preservar a qualidade das doses inseminantes.

Complementando essas descobertas, Tamanini *et al.* (2022) expandiram a pesquisa sobre o transporte de doses inseminantes ao investigarem o impacto da duração do transporte sobre a qualidade espermática. O estudo testou diferentes períodos de agitação, variando de 0 a 12 horas a uma taxa de 70 RPM, para simular o efeito do transporte. Os resultados indicaram que períodos prolongados de agitação, comuns em viagens longas, podem afetar adversamente as motilidades e a funcionalidade mitocondrial das células espermáticas. O pH aumentou de maneira quadrática nos diluentes de curta e longa duração à medida que o período de simulação de transporte se estendia, sugerindo que a duração do transporte é um fator crítico que necessita de atenção e controle rigoroso.

Mais recentemente, a pesquisa conduzida por Hafemeister *et al.* (2023) expandiram ainda mais o entendimento dos efeitos do transporte, correlacionando a intensidade da vibração e a duração do transporte com a qualidade espermática. Ao analisar 546 doses de 39 reprodutores suínos, os autores observaram uma deterioração proporcional nos parâmetros espermáticos em função da intensidade e duração do transporte, com efeitos mais pronunciados após quatro dias de armazenamento. A interação entre a vibração e a duração do transporte foi estatisticamente significativa, concluindo que tanto a intensidade quanto a duração das vibrações durante o transporte podem impactar negativamente a qualidade do

sêmen suíno, afetando a motilidade, a motilidade no TTR, o potencial mitocondrial e a integridade de membrana plasmática.

Esses estudos coletivamente destacam a necessidade crítica de sistemas de monitoramento robustos durante o transporte de doses inseminantes. A implementação de medidas preventivas, como o aprimoramento de embalagens para atenuar o estresse mecânico, o uso de veículos especializados com sistemas que controlem as emissões de vibração e temperatura, e a otimização de rotas para reduzir o tempo de trânsito, são estratégias que podem preservar a integridade das células espermáticas. No entanto, é importante destacar que todos os estudos anteriores foram realizados com embalagens tipo Tubo, e que atualmente não há comparações abrangentes disponíveis entre as principais embalagens utilizadas para envase de sêmen submetidas ao transporte, o que representa uma lacuna importante nessa linha de pesquisa.

A pesquisa contínua e o desenvolvimento de novas tecnologias de monitoramento são essenciais para assegurar que as doses inseminantes mantenham sua qualidade ótima até o momento da inseminação. A integração de dados de monitoramento em tempo real com sistemas de gestão logística pode facilitar a tomada de decisões e a implementação de melhorias contínuas nos processos de transporte. A indústria suína, portanto, está diante de uma oportunidade de aprimorar suas práticas logísticas, garantindo que a genética de alto valor seja efetivamente disseminada por meio de doses inseminantes de alta qualidade, maximizando o potencial reprodutivo e promovendo um futuro mais produtivo e rentável para o setor.

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do tempo de agitação de doses de sêmen de suínos armazenadas em embalagens do tipo Bag ou Tubo na qualidade dos parâmetros espermáticos durante o armazenamento.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao investigarmos os desafios enfrentados no transporte de doses de sêmen suíno, em um contexto de centralização das CPS, nosso objetivo foi elucidar o comportamento das células espermáticas envasadas nos dois principais tipos de embalagens mais utilizadas, a Bag e o Tubo quando submetidas a diferentes períodos de vibração decorrentes do transporte entre as CPS e granjas. Nas condições analisadas, os resultados obtidos confirmaram que a integridade e motilidade dos espermatozoides são influenciados por múltiplos fatores, incluindo o tipo de embalagem, tempo de agitação ao qual foram submetidos e duração do armazenamento. Doses envasadas em embalagens tipo Tubo apresentaram melhor qualidade espermática em relação à embalagem tipo Bag, especialmente quando submetidas à períodos prolongados de agitação. No entanto, observamos que o tempo de agitação exerce um efeito prejudicial na motilidade espermática, integridade celular, atividade mitocondrial e produção de espécies reativas ao oxigênio. Diante disso, ressaltamos a importância de medidas cautelosas durante o transporte das doses inseminantes, principalmente quando envasadas em Bags, sugerindo a possibilidade de desenvolvimento de novos dispositivos para minimizar os efeitos adversos do transporte. Como perspectiva para futuras pesquisas, investigações mais aprofundadas sobre os mecanismos envolvidos nos danos causados pela vibração durante o transporte, como a fluidodinâmica e capacidade de absorção de impactos devem ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, fertility and development**, v. 7, n. 4, p. 659–668, 1995.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction & Development**, v. 84, p. 1039–1052, 2017.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology lab corner: Reflections on casa after 25 years. **Journal of andrology**, v. 25, n. 3, p. 317–325, 2004.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5–17, 2014.
- ANDERSSON, M. A. *et al.* Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. **Toxicology In Vitro**, v. 24, p. 2014–2052, 2010.
- ANGRIMANI, D. DE S. R. *et al.* Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 277–283, 2015.
- AX, R. L. *et al.* Semen Evaluation. **Reproduction in Farm Animals**. v. 82, p. 363–375, 2016.
- BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**. v. 15 (6), p. 1338–1344, 2000.
- BATES, M. K.; PHILLIPS, D. S.; O'BRYAN, J. The effect of shaker agitation rate and orbit on growth of cultured bacteria. **Bio Tech Int**, v. 22, p. 23-25, 2010.
- BENNEMANN, P. E. *et al.* Characterization of boar studs in Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, 2020.
- BETARELLI, R. P. *et al.* The achievement of boar sperm in vitro capacitation is related to an increase of disrupted disulphide bonds and intracellular reactive oxygen species levels. **Andrology**, v. 6, p. 781–797, 2018.
- BOE-HANSEN, G. B.; SATAKE, N. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. **Theriogenology**, v. 137, p. 93–103, 2019.
- BONET, S. *et al.* Boar reproduction. **Springer**, 2013.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* Exame do ejaculado. In: Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. **Suinocultura em ação**, vol. 2 ed., v. cap. 7, 2005.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* I. New artificial insemination technologies for swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 80–84, 2015.
- BROEKHUIJSE, M. *et al.* Application of computer-assisted semen analysis to explain

- variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 3, p. 779–789, 2011.
- CASAS, I.; FLORES, E. Gene Banking: The Freezing Strategy, **Boar Reproduction**, p. 551–588, 2013.
- CASEY, J.R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. **Molecular and Cellular Biology***, v. 11, p. 50-61, 2010.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal - **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. CBRA, Belo Horizonte. v. 3 ed., p. 104, 2013.
- CHEN, Z. *et al.* The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J. **Andrology***. v. 27 (1), p. 112–120, 2006.
- CHEN, W.Y. *et al.* Cl⁻ is required for HCO₃⁻ entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: Involvement of a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A3) and CFTR. **Biology of Reproduction**, v. 80 (1), p. 115–123, 2009.
- CORREIA, J.; MICHELANGELI, F.; PUBLICOVER, S. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. **Reproduction**, v.150, p. 65–76., 2015.
- CROSS, N. L. Effect of pH on the development of acrosomal responsiveness of human sperm. **Andrologia**, v. 39, p. 55–59, 2007.
- DARR, C. R. *et al.* Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion sperm spermatozoa health and varies with cryopreservation media. **Theriogenology** v. 86, p. 1382–1392, 2016.
- 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.
- DE HAAN, L. R. *et al.* Experimental Conditions That Influence the Utility of 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH₂-DA) as a Fluorogenic Biosensor for Mitochondrial Redox Status. **Antioxidants (Basel)**, v. 11, n. 8, p. 1424 2022.
- ELLINGER, I. The calcium-sensing receptor and the reproductive system. **Front Physiology**, v. 7, p. 371, 2016.
- ESCH, M. Quality standard of Minitube's boar semen tubes. **Technical Report**, v. 4, 2023.
- ESTRADA, E. *et al.* The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. **Cryobiology**, v. 78, p. 56–64, 2017.
- 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. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. **Avances en Tecnología Porcina (España)**, 2004.

- GADEA J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, p. 431, e. 44, 2005.
- GALIĆ, I. *et al.* Effect of an Antioxidant Supplement Combination on Boar Sperm, **Animals**, v. 12, p. 1301, 2022.
- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127–138, 1996.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 222–229, 1999.
- 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.
- GOLDBERG, A. M. G. *et al.* The impact of bacterial contamination of the ejaculate and extender on the quality of swine semen doses. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 5, p. 3095–3104, 2017.
- GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691–1703, 2000.
- GROSSFELD, R.; BRAUN, N.; ESCH, M. Quality standard of Minitube's QuickTip® semen bags. **Technical Report**, v.6, 2020.
- GUO, H.; GONG, Y.; H E, B; *et al* Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. **Theriogenology**, v. 87, p. 276–283, 2017.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700–1708, 2012.
- HAFEMEISTER, T. *et al.* Boar Semen Shipping for Artificial Insemination: Current Status and Analysis of Transport Conditions with a Major Focus on Vibration Emissions. **Animals**, v. 12, n. 10, 2022.
- HAFEMEISTER, T. *et al.* Intensity and Duration of Vibration Emissions during Shipping as Interacting Factors on the Quality of Boar Semen Extended in Beltsville Thawing Solution. **Animals**, v. 13, n. 5, p.952, 2023.
- HAFEZ, E. S. E. Semen evaluation. **Reproduction in Farm animals**, v. 5, p. 405–423, 1993.
- JOHNSON, L. A. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 143–172, 2000.
- JONES, J. M.; BAVISTER, B. D. Acidification of Intracellular pH in Bovine Spermatozoa Suppresses Motility and Extends Viable Life. **Journal of Andrology**, v. 21 (5), p. 616–624, 2000.

- JUONALA, T. et al. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 3-4, p. 155–158, 1998.
- KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 1–6, 2012.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26(4), p. 239–257, 1972.
- KHOSRAVI, F. *et al.* Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. **Andrologia**, v. 46, n. 1, p. 17–23, 2014.
- KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 83–93, 2016.
- KUMARESAN, A. *et al.* Preservation of boar semen at 18 C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 110, n. 1–2, p. 162–171, 2009.
- LOSANO, J.D.A. *et al.* The stimulated glycolytic pathway is able to maintain ATP levels and kinetic patterns of bovine epididymal sperm subjected to mitochondrial uncoupling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–8, 2017.
- LUCCA, M. S. *et al.* Effects of the classification of boars according to progressive sperm motility and the extender type on the reproductive performance of a single fixed-time insemination. **Theriogenology**, v. 161, p. 120–125, 2021.
- MALIK, A.N.; CZAJKA, A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? **Mitochondrion**, v. 13, p. 481–492, 2013.
- MARCHETTI, C. *et al.* Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Human reproduction**, v. 19, n. 10, p. 2267–2276, 2004.
- MARCOS, C. P. *et al.* Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 15°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 26, p. 112–116, 1991.
- MARTÍN-HIDALGO, D.; BARÓN, F.J.; BRAGADO, M.J. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. **Theriogenology**, v.75, p. 1550–1560, 2011.
- MATOS, D. L. *et al.* Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225–232, 2008.
- MAY-PANLOUP, P. *et al.* Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility.

Human Reproduction, v. 18, p. 550–556, 2003.

MCPHERSON, F. J.; NIELSEN, S. G.; CHENOWETH, P. J. Semen effects on insemination outcomes in sows. **Animal reproduction science**, v. 151, n. 1–2, p. 28–33, 2014.

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. *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.

MORAES, C. R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, v. 194, p. 71–80, 2018.

NERIN, C. *et al.* Compounds from multilayer plastic bags cause reproductive failures in artificial insemination. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics**, fourth ed. Academic Press, San Diego, 2013.

PASCHOAL, A.F. *et al.* Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen. **Theriogenology**, v. 175, p. 54–60, 2021.

PASSARELLI, M.; PAVANELI, A. P. P.; RAVAGNANI, G. M. Effects of different equilibration times at 5°C on boar sperm cryotolerance. **Animal Reproduction Science**, v. 219, p. 106547, 2020.

PEÑA, F.J. *et al.* A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 28 (2), p. 107–114, 2005.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. **Biotechniques**, v. 50, p. 98–115, 2011.

PETRUNKINA, A. M. *et al.* Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. **Reproduction**, v. 121, p. 889–896, 2001.

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, 2022.

QUIRINO, M. *et al.* Estimation of sperm concentration limits to produce intrauterine insemination doses in swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 58, n. 6, p. 785–792, 2023.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480–4486, 1991.

- RIBEIRO, D.; PESSOA, M. M. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93–99, 2008.
- 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, p. 161–172, 1996.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. *et al.* Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 1, p. 514–535, 2005.
- SAKKAS, D.; MANICARDI, G. C.; TOMLINSON, M. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 17(5), p. 1193–1203, 2002.
- SARAVIA, F. *et al.* Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. **Theriogenology**, v. 68, p. 196–203, 2007.
- 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.* Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 127, p. 15–20, 2019.
- SCHULZE, M. *et al.* Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. **Theriogenology**, v. 80, n. 9, p. 990–998, 2013.
- SCHULZE, M; RÜDIGER, K. HACCP approaches to boar semen production. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, 2014.
- SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of Boar Semen Doses During Storage Affects Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 684–687, 2015.
- TAKESHITA, K. *et al.* X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. **Natural Structural & Molecular Biology**, v. 21, p. 352–357, 2014.
- TAMANINI, M. S. C. *et al.* Impact of agitation time of boar semen doses on sperm traits in short- and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p.107159, 2022.
- TARDIF, S. *et al.* The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 447–459, 1999.
- TORRES, M. A. *et al.* The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 C prior to short-cryopreservation protocols. **Cryobiology**, v. 86, p. 58–64, 2019.
- 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. 151–154, 2010.

- 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.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present, and future challenges. **Theriogenology**, v. 137, p. 2–7, 2019.
- WANG, D. *et al.* A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). **National Academy of Sciences**, v. 104, p. 9325–9330, 2007.
- WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. **Free Radic. Biol. Med**, v. 43, p. 995–1022, 2007.
- WEITZE, K. F.; LE, X. T.; WABERSKI, D. Influence of seminal plasma and extender on the quality of highly diluted boar semen. **Animal Reproduction Science**, 46, 97–98, 2011.
- WILLENBURG, K. *et al.* Comparison of extended boar semen cooling rates for semen packaged in bags and tubes. In: **Proceedings of the 42nd annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians**, p. 397, 2011.
- WOLKEN, G. G.; ARRIAGA, E. A. Simultaneous measurement of individual mitochondrial membrane potential and electrophoretic mobility by capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 4217–42, 2014.
- WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, n. 5756, p. 555–556, 1980.
- YESTE, M. *et al.* Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, p. 789–798, 2018
- YESTE, M. *et al.* The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 265–274, 2010.
- ZHANG, X.G. *et al.* Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 263–269, 2015.
- ZHOU, J. *et al.* The semen pH affects sperm motility and capacitation. **PLoS One**, 10 (7), 2015.
- ZHU, Z. *et al.* Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, p. 159–171, 2019.