

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Rodrigo Dalmina Rech**

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO AO DILUENTE DE SÊMEN  
SUÍNO COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO:  
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

Santa Maria, RS  
2020

**Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da  
Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.**

Rech, Rodrigo Dalmina  
ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO AO DILUENTE DE SÊMEN  
SUÍNO COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO: AVALIAÇÃO  
DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS / Rodrigo Dalmina Rech.-  
2020.

59 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Rigon Rossi  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Antioxidante 2. Acondicionamento térmico 3. Baixa  
fertilidade 4. Susceptibilidade 5. Viabilidade  
espermática I. Rossi, Carlos Augusto Rigon II. Título.

©2020

Todos os direitos reservados a Rodrigo Dalmina Rech. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: R. Valentim Fernandes, nº 119 (Apto 305); Bairro Nossa Senhora de Lourdes; Santa Maria - RS.

Fone: (054)99664-2842; E-mail: rodrigodalminarech@hotmail.com.

**Rodrigo Dalmina Rech**

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO AO DILUENTE DE SÊMEN SUÍNO COM  
MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO: AVALIAÇÃO DOS  
PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi

Santa Maria, RS  
2020

**Rodrigo Dalmina Rech**

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO AO DILUENTE DE SÊMEN SUÍNO COM  
MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO: AVALIAÇÃO DOS  
PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 13 de fevereiro de 2020:**

---

**Carlos Augusto Rigon Rossi, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

---

**Gilson Antônio Pessoa, Dr. (UFSM)**

---

**Bruno Neutzling Fraga, Dr. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2020

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Isair e Helenita, ao meu irmão Sandro e avós Maximino e Inês, pelo apoio nesta etapa de aperfeiçoamento e por entenderem meu desejo de crescimento. Aos amigos que me mantiveram erguido nos momentos de fraqueza, dando-me auxílio em dificuldades e sendo a causa, muitas vezes, de minha alegria.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por permitir que esta oportunidade fosse concedida a mim, um sonho que se concretiza e que devo à Ele todo meu esforço, sofrimento e realização!*

*Agradeço aos meus pais Isair e Helenita, pelo apoio neste período, por emanarem forças para que conseguisse superar minhas dificuldades e, principalmente, por entenderem esse desejo de seguir me aperfeiçoando na área acadêmica. Também ao meu irmão Sandro, que assumiu minhas funções na propriedade, tua presença é indispensável para mim!*

*Aos meus avós Maximino e Inês, saibam que os amo muito, foram os principais responsáveis pela minha criação e desenvolvimento de caráter, junto aos meus pais, onde sempre terei como exemplo as dificuldades e superações que enfrentaram em sua vida para que pudéssemos estar aqui hoje!*

*Não posso deixar de agradecer ao amigo que neste novo ciclo a vida me proporcionou, Jovani, tu és incrível! Fostes um irmão para mim, obrigado por ter lhe conhecido!*

*Agradeço imensamente ao meu orientador, Carlos, pela confiança a mim depositada! Tua presença e auxílio foram essenciais à minha formação, obrigado por tua dedicação, paciência e ajuda em tudo que sempre precisei.*

*Às minhas colegas de mestrado, Luara e Janine, pelo companheirismo, conhecimento compartilhado e risadas que demos juntos no Laboratório. Com certeza contribuíram muito para meu saber neste período.*

*Aos estagiários do ANDROLAB, agradeço ao Cristian, que em meio a seu experimento me acolheu e ensinou todo o funcionamento do laboratório e manejo com os animais. Também a uma grande amiga que levo para a vida, Analaura, foste essencial para meu desempenho, amizade e auxílio com gráficos e estatística de trabalhos.*

*Agradeço aos funcionários da ACSURS, Luciano, Patrícia, Kananda, Karina, Vagner e Bernardo, pela ajuda e disponibilidade de uso do laboratório e animais da Central de Produção de Sêmen, para o desenvolvimento de minha pesquisa.*

*Agradeço ao Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho, por disponibilizar o uso do laboratório de Biotecnologia da UNIVATES, bem como a disponibilidade da Anna Flávia em me auxiliar com as análises de citometria de fluxo.*

*Por fim, agradeço a Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nome dos professores envolvidos nas disciplinas, bem como a CAPES. Não posso esquecer de ti Maria, que me auxiliaste muito nesta trajetória, muito obrigado!*

*“Não deixem que tirem de vocês o desejo de construir coisas grandes e sólidas em sua vida! É isso que faz com que sigamos sempre em frente. Não se contentem com metas pequenas! Aspirem à felicidade, tenham coragem de sair de dentro de si!”.*

**S.S. Papa Francisco**

## RESUMO

# ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO AO DILUENTE DE SÊMEN SUÍNO COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

AUTOR: Rodrigo Dalmina Rech

ORIENTADOR: Carlos Augusto Rigon Rossi

Objetivou-se avaliar a viabilidade de Doses Inseminantes (DI) de suínos com ejaculados classificados como sensíveis ao acondicionamento à 17°C, acrescidas de ácido clorogênico e identificar qual concentração do antioxidante obteve melhor eficiência na manutenção da capacidade fecundante ao decorrer de 168 horas. A Etapa I contemplou 25 suínos, coletados uma vez por semana, por 5 semanas consecutivas, totalizando 5 ejaculados por animal. As DI produzidas foram analisadas quanto a Motilidade espermática Progressiva (MP) nas horas 0, 120 e 168 e classificadas em grupos, de acordo com a sensibilidade ao resfriamento, sendo maior, média e menor sensibilidade, tabulando e classificando os dados em planilha eletrônica da seguinte forma:  $MP < 60\%$  em 120 horas (maior);  $MP \geq 60\%$  em 120 horas e  $< 60\%$  em 168 horas (média) e  $MP \geq 60\%$  em 168 horas (menor). Obteve-se 4 reprodutores que apresentaram no mínimo três dos cinco ejaculados no primeiro padrão de seleção. Na Etapa II, estes animais pré-selecionados foram coletados por 4 semanas, 1 vez por semana, totalizando 4 ejaculados por animal, com as DI de 45 mL submetidas a cinco tratamentos: T1: DI com Androstar® Plus (AND) (controle); T2: DI com AND + ácido clorogênico (ChA - Chlorogenic acid crystalline, C3878 - Sigma-Aldrich®) ( $1.500 \mu\text{g DI}^{-1}$ ); T3: DI com AND + ChA ( $3.000 \mu\text{g DI}^{-1}$ ); T4: DI com AND + ChA ( $4.500 \mu\text{g DI}^{-1}$ ); T5: DI com AND + ChA ( $6.000 \mu\text{g DI}^{-1}$ ). Avaliou-se os parâmetros espermáticos pelo CASA, Citometria de Fluxo, Teste de Termo Resistência (TTR) e Morfologia Espermática até 168 horas do estudo. A MT no T1 foi 4,43% superior ( $p < 0,05$ ) em relação a T4. Nas IM, T4 foi 17,21% superior ( $p < 0,05$ ) que T1. Quanto às horas, MT e MP decresceram ( $p < 0,05$ ) de 18,52% e 22,84%, respectivamente, no decorrer de H0 até H168. Nas ML e IM houve aumento ( $p < 0,05$ ) de 22,95% e 64,19%, respectivamente, de H0 para H168. No TTR, a MT no T1 foi 7,86% maior ( $p < 0,05$ ) que T4. A variável IM apresentou T4 17,98% maior ( $p < 0,05$ ) que T1. Nas horas de avaliação do TTR, MT decresceu ( $p < 0,05$ ) 3,87% da H120 para H168 e IM aumentou ( $p < 0,05$ ) 8,89% referente ao mesmo período. Na morfologia espermática as alterações primárias (PR) na H0 foram 68,97% maiores ( $p < 0,05$ ) em relação a H120 e 31,16% maiores ( $p < 0,05$ ) em relação a H168. A variável IN foi 20,45% maior ( $p < 0,05$ ) na H120 em relação a H0 e 11,91% maior ( $p < 0,05$ ) em relação a H168. Nas integridades de membrana os valores de ARML e AIMI foram na H0 63,27% maior ( $p < 0,05$ ) que H168 e em H168 3,57% maior ( $p < 0,05$ ) que H0, respectivamente. A adição de ácido clorogênico, nas concentrações utilizadas, não apresenta benefícios em prolongar a viabilidade espermática. Ainda, não houve melhora quanto a morfologia espermática e integridade de membrana ao final de 168 horas de armazenamento a 17 graus Celsius.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Acondicionamento térmico. Baixa fertilidade. Susceptibilidade. Viabilidade espermática.



## ABSTRACT

### ADDITION OF CHLOROGENIC ACID TO THE SWINE SEMEN DILUENT WITH GREATER SENSITIVITY TO COOLING: EVALUATION OF SPERM PARAMETERS

AUTHOR: Rodrigo Dalmina Rech  
ADVISER: Carlos Augusto Rigon Rossi

The objective of this study was to evaluate the viability of Inseminating Doses (DI) of pigs with ejaculates classified as sensitive to packaging at 17 °C, plus chlorogenic acid and to identify which concentration of the antioxidant obtained the best efficiency in maintaining the fertilizing capacity over 168 hours. Stage I included 25 pigs, collected once a week, for 5 consecutive weeks, totaling 5 ejaculates per animal. The produced DIs were analyzed for Progressive sperm motility (MP) at hours 0, 120 and 168 and classified in groups, according to the sensitivity to cooling, being higher, medium and lower sensitivity, tabulating and classifying the data in a spreadsheet of the as follows: MP <60% in 120 hours (higher); MP ≥ 60% in 120 hours and <60% in 168 hours (average) and MP ≥ 60% in 168 hours (lowest). Four breeders were obtained that had at least three of the five ejaculated in the first selection pattern. In Stage II, these pre-selected animals were collected for 4 weeks, once a week, totaling 4 ejaculates per animal, with the 45 ml DIs submitted to five treatments: T1: DI with Androstar® Plus (AND) (control) ; T2: DI with AND + chlorogenic acid (ChA - Chlorogenic acid crystalline, C3878 - Sigma-Aldrich ®) (1,500 µg DI-1); T3: DI with AND + ChA (3,000 µg DI-1); T4: DI with AND + ChA (4,500 µg DI-1); T5: DI with AND + ChA (6,000 µg DI-1). The sperm parameters were evaluated by CASA, Flow Cytometry, Term Resistance Test (TTR) and Sperm Morphology up to 168 hours of the study. TM at T1 was 4.43% higher (p <0.05) compared to T4. In MI, T4 was 17.21% higher (p <0.05) than T1. As for the hours, MT and MP decreased (p <0.05) from 18.52% and 22.84%, respectively, during the period from H0 to H168. In ML and IM there was an increase (p <0.05) of 22.95% and 64.19%, respectively, from H0 to H168. At TTR, TM at T1 was 7.86% higher (p <0.05) than T4. The variable IM presented T4 17.98% higher (p <0.05) than T1. In the hours of TTR assessment, MT decreased (p <0.05) 3.87% from H120 to H168 and IM increased (p <0.05) 8.89% for the same period. In sperm morphology, the primary changes (PR) in H0 were 68.97% higher (p <0.05) compared to H120 and 31.16% higher (p <0.05) compared to H168. The IN variable was 20.45% higher (p <0.05) in H120 compared to H0 and 11.91% higher (p <0.05) in relation to H168. In the membrane integrity, the ARML and AIMI values were 63.27% higher in H0 (p <0.05) than H168 and in H168 3.57% higher (p <0.05) than H0, respectively. The addition of chlorogenic acid, in the concentrations used, has no benefits in prolonging sperm viability. Still, there was no improvement in sperm morphology and membrane integrity after 168 hours of storage at 17 degrees Celsius

**Keywords:** Antioxidant. Thermal conditioning. Low fertility. Susceptibility. Sperm viability.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 - Média  $\pm$  erro padrão da morfologia espermática (alterações primárias, secundárias, terciárias e células íntegras).....46

Tabela 2 - Média  $\pm$  erro padrão da integridade de membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo, considerando células com acrossoma íntegro e membrana lesada (AIML), acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), acrossoma íntegro e membrana íntegra (AIMI) e acrossoma reagido e membrana íntegra (ARMI), nas horas 0, 120 e 168 de análise.....47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do sistema reprodutivo do macho suíno.....	16
Figura 2 - Ejaculado de reprodutor suíno ao chegar para análise em laboratório. ....	18
Figura 3 - Morfologia da célula espermática. ....	19
Figura 4 - Estrutura química do Ácido Clorogênico (Ácido 5-cafeoilquínico).....	24
Figura 5 - Imagem captada pelo sistema CASA (SpermVision) e classificada quanto aos movimentos espermáticos. ....	26
Figura 6 - Morfologia espermática: anormalidade primária (cabeça dupla). ....	28
Figura 7 - Gráficos gerados a partir da leitura da amostra submetida ao citômetro de fluxo. .	29

### ARTIGO 1

Figura 1: Motilidade Total das doses inseminantes com a adição de Ácido Clorogênico.....	44
Figura 2: Motilidade Total a partir do teste termo resistência das doses inseminantes com adição de Ácido Clorogênico.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSURS	Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul
AIMI	Acrossoma Íntegro e Membrana Íntegra
AIML	Acrossoma Íntegro e Membrana Lesada
ALH	Deslocamento Lateral da Cabeça
AND	Androstar <sup>®</sup> Plus
ARMI	Acrossoma Reagido e Membrana Íntegra
ARML	Acrossoma Reagido e Membrana Lesada
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CAT	Catalase
ChA	Ácido Clorogênico
CPS	Central de Produção de Sêmen
Cu	Cobre
DI	Doses Inseminantes
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fe	Ferro
FITC	Isotiocionato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione
H	Hora
IA	Inseminação Artificial
IM	Imóveis
IN	Íntegras
IP	Iodeto de Propídio
Mi	Minutos
ML	Motilidade Local
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Primário
Prx	Peroxirredoxinas
PSA	<i>Pisum sativum</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RS	Rio Grande do Sul
S	Semana
SE	Secundário
SOD	Superóxido Dismutase
T	Tratamento
TE	Terciário
TTR	Teste de Termo Resistência
UNIVATES	Universidade do Vale do Taquari
VCL	Velocidade Curvilínea
O <sub>2</sub>	Oxigênio
-O <sub>2</sub>	Radical Superóxido
-OH	Radical Hidroxila
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR DO MACHO SUÍNO	16
2.2	O EJACULADO .....	17
2.3	A CÉLULA ESPERMÁTICA .....	18
2.4	SENSIBILIDADE DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO .....	19
<b>2.4.1</b>	<b>Fator reprodutor</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Temperatura e período de armazenagem</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Meios diluidores</b> .....	<b>21</b>
2.5	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (ROS) PELO ESPERMATOZOIDE .....	22
2.6	MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE .....	23
2.7	ÁCIDO CLOROGÊNICO .....	24
2.8	TESTES DE VIABILIDADE NA CÉLULA ESPERMÁTICA .....	25
<b>2.8.1</b>	<b>Computer Assisted Sperm Analysis (Sistema CASA)</b> .....	<b>26</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Morfologia espermática</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8.3</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1 – PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE SUÍNOS COM EJACULADO SENSÍVEL AO RESFRIAMENTO APÓS A ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
	<b>ANEXO A – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de proteína animal de origem suína vem crescendo 0,5% ao ano, cujo principal produtor é a China, sendo o Brasil consolidado como quarto maior produtor e exportador (MARTINS et al., 2018). Para tal desempenho, as biotecnologias da reprodução animal se fazem essenciais, tendo como principal a Inseminação Artificial (IA), desenvolvida como alternativa de melhoria da eficiência reprodutiva e produtividade do plantel. A IA traz consigo muitos benefícios, tais como: o ganho genético da criação através da introdução do sêmen de reprodutores de alto valor zootécnico; a redução do número de reprodutores e por consequência menor custo com a manutenção de cachacos; a maior segurança sanitária e detecção precoce de falhas reprodutivas relacionadas ao varrão (CANDINI et al., 2000).

O sucesso da IA, em parte, se deve ao correto acondicionamento das Doses Inseminantes (DI), com intuito de evitar os danos celulares causados pelos radicais livres formados no meio espermático (TONIOLLI, 2012). A temperatura de armazenagem das DI (15°C-18°C) e a correta preparação do diluente para conservar os espermatozoides em condições adequadas durante sua estocagem interferem diretamente na durabilidade da dose (ALVARENGA et al., 2019). Existem técnicas de criopreservação de sêmen suíno, porém a mais utilizada é o resfriamento, devido os ótimos resultados encontrados na taxa de prenhez e ao menor dano causado à célula espermática (VASCONCELOS et al., 2001).

A produção espermática varia entre reprodutores, uma vez que raça, época do ano, meio ambiente, idade do reprodutor, nível nutricional e tamanho dos testículos exercem grande influência (ZANARDO, 2016). Nesse contexto, existem tanto reprodutores de boa genética com produção, duração e resistência mais prolongadas de sêmen quanto varrões com parâmetros seminais inferiores. Esses últimos podem passar despercebidos e interferir nas taxas de fecundidade e retorno ao estro das fêmeas. Nas Centrais de Produção de Sêmen (CPS), os cachacos são exigidos ao máximo quanto a produção de ejaculados e permanecem curto período de tempo, o que gera um índice de reposição superior a 80% (MELLAGI et al., 2019). Desta maneira, avaliações dos gametas em laboratório para monitorar a durabilidade das DI produzidas são necessárias para identificar animais com baixa resistência de seus ejaculados ao decorrer do tempo de armazenamento e intervir através da utilização de diluidores enriquecidos com antioxidantes (ANDRADE et al., 2010).

Conforme Murgas et al. (2002), os diluidores, também chamados de extensores de sêmen, têm a função de garantir a conservação das células espermáticas, fornecendo-lhes nutrientes e substâncias crioprotetoras ou fatores de resistência. O espermatozoide suíno, por

sua vez, é susceptível ao choque térmico, principalmente em casos onde o ejaculado fresco é rapidamente resfriado a temperaturas abaixo de 15°C, ocasionando a perda da viabilidade de grande parte das células (JULIANO et al., 2009). Portanto, o diluente por meio de seus componentes provê a manutenção da capacidade fecundante dos gametas, pH adequado, pressão osmótica ideal, previne choque térmico, estabiliza enzimas, mantém a integridade de membrana prevenindo a formação de radicais livres e inibe o crescimento bacteriano (MARTINS, 2015).

O termo radical livre, em seu significado mais abrangente, remete à espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas ao oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) incluem as espécies de radicais livres e outras que, mesmo por não possuir elétrons desemparelhados são muito reativas por sua instabilidade no meio em que são produzidas (RIBEIRO et al., 2005). Uma alternativa para reduzir a quantidade de radicais livres que inevitavelmente é gerada no meio seminal, devido a oxidação de estruturas dos espermatozoides é adicionar antioxidantes exógenos ao diluente para neutralizar o excesso de ROS. Os extensores de sêmen possuem em sua composição esses produtos, porém oxidam rapidamente não mantendo seu efeito. Uma possível substância a ser utilizada é o ácido clorogênico (*Chlorogenic Acid* - ChA), por conter em suas características a propriedade antioxidante necessária para manutenção da homeostase no plasma seminal (PEREIRA, 2014).

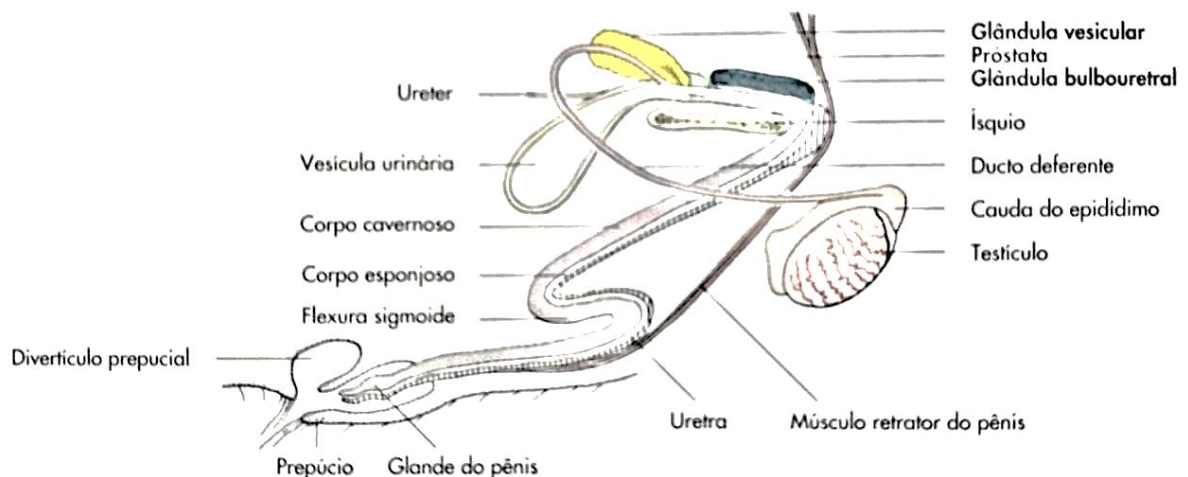
Os resultados encontrados na literatura em relação a utilização do ChA como meio enriquecedor do diluente espermático na elaboração de DI são incipientes e pouco conclusivos. E ainda, nenhum trabalho foi desenvolvido com ejaculados obtidos a partir de reprodutores sensíveis ao resfriamento espermático. Portanto, o objetivo neste trabalho foi avaliar a viabilidade espermática de doses inseminantes sensíveis ao acondicionamento e identificar a concentração de ChA que apresenta melhor eficiência para conservação das doses em temperatura de 17 graus Célsius ao longo do tempo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR DO MACHO SUÍNO

O sistema reprodutivo de animais do sexo masculino é constituído pelo escroto, testículos, epidídimos, cordões espermáticos, pênis, prepúcio e glândulas anexas (Figura 1). Nos suínos estas últimas são compostas pelas glândulas vesiculares (órgãos pares, cobrindo parcialmente a próstata), próstata (pequena, dorsal ao início da uretra difundindo-se à sua extensão) e bulbouretrais (volumosas, pares, simétricas, lobuladas, que se estendem cranial à extremidade da pelve até a parte inferior da bexiga) (CBRA, 2013). As glândulas vesiculares têm a função de produzir plasma seminal, enquanto a próstata produz a fração pré-espermática e as glândulas bulbouretrais produzem a fração gelatinosa do ejaculado. Tais estruturas localizam-se na porção pélvica da uretra (CERVENY et al., 2004).

Figura 1 - Anatomia do sistema reprodutivo do macho suíno



Fonte: König e Liebich (2011).

O escroto, com função de termo regulação do testículo, é a região anatômica formada pelo tegumento e pela túnica dartos, que abrigam e envolvem este órgão, recobrem o epidídimo e parte do cordão espermático. Nos suínos os testículos localizam-se na região perineal, em plano inclinado, mas de forma não pendular como em outras espécies, onde desde o nascimento devem estar alojados na bolsa escrotal. Eles têm função de síntese de espermatozoides e



testosterona. Ligado ao testículo, o epidídimo é o órgão envolvido na maturação final dos gametas masculinos, constituído por cabeça, corpo e cauda, sendo que a primeira estrutura se localiza no polo ventral testicular e tem forma difusa; a cauda se aloca no polo dorsal e exhibe um formato de noz, com consistência elástica; e o corpo do epidídimo se estende medialmente ao testículo, com pequena espessura. O cordão espermático contém a si agregado os vasos sanguíneos, denominados de plexo pampiniforme, vasos linfáticos e nervos, além do ducto deferente e do músculo cremaster, ou seja, suas estruturas conectam o testículo com o corpo do animal (MELLAGI et al., 2019).

O pênis, órgão de acasalamento do macho, composto por tecido conjuntivo, tecido erétil e músculo, onde a uretra passa em seu interior. Envolvendo o pênis está o prepúcio, onde na espécie suína se subdivide no divertículo prepucial, estrutura que contém restos de urina, sêmen e células de descamação e que se localiza na região dorsal do prepúcio (CBRA, 2013). Quando estimulado, o pênis é altamente irrigado por sangue o que causa seu enrijecimento e permite a introdução na vagina da fêmea. Na espécie suína, assim como em touros e carneiros, o pênis na forma não ereta fica disposto dobrado na cavidade pélvica em formato de “S”, denominada flexura sigmoide. Seu mecanismo de ereção difere um pouco das demais espécies, onde além da irrigação sanguínea a flexura é desfeita e o órgão é exteriorizado e introduzido na fêmea (COLVILLE e BASSERT, 2010).

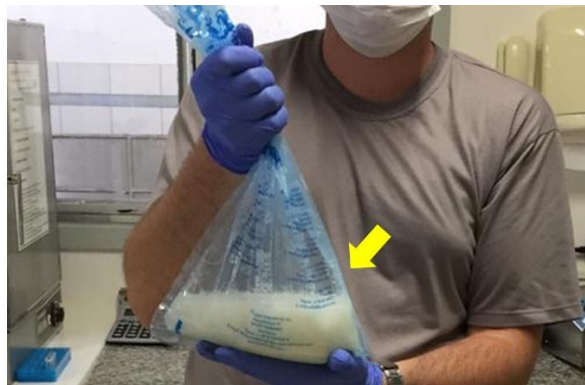
## 2.2 O EJACULADO

O ejaculado (Figura 2) é constituído por um *pool* de secreções dos órgãos sexuais (testículos e epidídimo) e das glândulas acessórias a fim de fornecer o aporte energético aos espermatozoides, bem como sua proteção à choques de temperatura, pH e osmolaridade. Para tanto, o fluído contém polipeptídeos que atuam na capacidade fecundante da célula, conferem imunidade e atuam como antioxidantes prevenindo a ação das ROS, amplamente formadas no plasma seminal de suínos. Ainda, o plasma é responsável em prover condições adequadas para a manutenção da motilidade, da sobrevivência e do transporte espermático, tanto no sistema reprodutor do macho, quanto da fêmea (ARAÚJO, 2014).

Conforme Pavaneli (2018), o ejaculado pode ser dividido em quatro fases distintas: a primeira, a fração pré-espermática, provém das glândulas bulbouretrais e próstata, são os primeiros jatos da ejaculação, de coloração translúcida e com função de fazer a limpeza da uretra e deve ser descartada no momento da coleta. A segunda fase, denominada de fase rica, é composta pelo fluído epididimário e por cerca de 70% dos espermatozoides, conferindo-lhe um

aspecto leitoso. A terceira fase, chamada de fase pobre por conter o restante dos espermatozoides e possuir aspecto soroso, oriunda das vesículas seminais e próstata. A quarta e última fase, a porção gelatinosa, é secretada lentamente pelas glândulas bulbouretrais, em maior quantidade ao final da ejaculação, onde fisiologicamente em monta natural tem a ação de tampão da cérvix. Nem sempre as fases ocorrem nessa ordem, alternando muitas vezes entre si, com exceção da primeira.

Figura 2 - Ejaculado de reprodutor suíno ao chegar para análise em laboratório.



Fonte: ACSURS (2019).

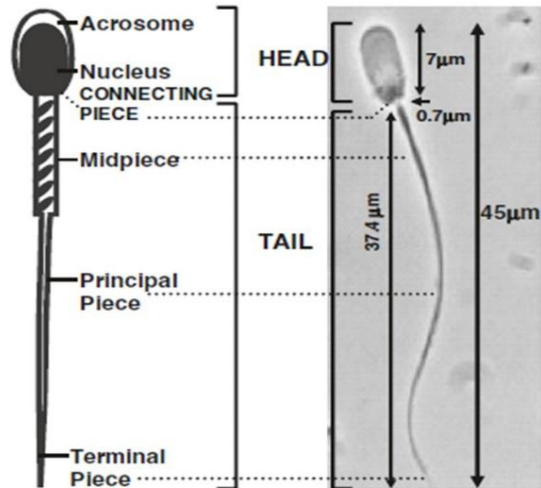
### 2.3 A CÉLULA ESPERMÁTICA

O gameta masculino é sintetizado no testículo e estocado no epidídimo, local onde finda o processo de maturação e aguarda a ejaculação (COLVILLE; BASSERT, 2010). O espermatozoide, considerado uma célula altamente especializada e complexa, é composto por uma arquitetura que atua diretamente em sua função que é a fecundação do ovócito. Ao se falar em membrana plasmática espermática, considera-se essa uma grande particularidade da espécie suína, devido sua composição ser responsável pelos principais danos a si causados, por fatores extrínsecos como a temperatura ou intrínsecos como as ROS (ANDRADE et al., 2017).

Os espermatozoides, células longas e finas, são subdivididos em três partes principais (Figura 3): cabeça, peça intermediária e cauda. A primeira estrutura é responsável por alojar o núcleo celular e é recoberta por uma estrutura terminal denominada acrossomo, que contém enzimas digestivas liberadas no contato com o gameta feminino. A segunda é responsável por conter inúmeras mitocôndrias, ou seja, executa a respiração celular e provê energia a célula. A

terceira, também denominada de flagelo faz a locomoção da célula por meio de seus movimentos contráteis (COLVILLE; BASSERT, 2010).

Figura 3 - Morfologia da célula espermática.



Fonte: Bonet et al. (2013).

A ejaculação, ocorrente no trato reprodutivo da fêmea, atinge a porção do istmo, região que ocorre a ovulação. Neste local os espermatozoides são capacitados para atingirem o ovócito, onde ao contato com o mesmo sofrem reação acrossomal tocando a zona pelúcida. Para que tal evento aconteça é necessário que as membranas espermáticas plasmáticas e acrossomal estejam íntegras, sem terem sofrido ação das ROS, tornando possível a utilização em técnicas de reprodução animal como a fertilização *in vitro* (FIV) e IA. Conforme a literatura, todas as etapas do processamento do sêmen podem causar danos espermáticos, por isso a importância da avaliação imediata após a coleta para obtenção de dados reais (SILVA; GADELLA, 2006).

## 2.4 SENSIBILIDADE DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO

### 2.4.1 Fator reprodutor

Na espécie suína a sensibilidade ao resfriamento de ejaculados é variável devido a fatores intrínsecos ao reprodutor. Para tal detecção, nas CPS são executados testes *in vitro* do ejaculado com a finalidade de prever a fertilidade dos reprodutores, tais como morfologia e

motilidade espermática, possibilitando descartar animais com parâmetros espermáticos ruins. A longevidade do sêmen difere entre os ejaculados, sendo particular de cada organismo, onde estudos de Gadella et al. (1993), mostram uma correlação entre componentes do pasma seminal, além de constituintes do próprio gameta. Devido a ampla utilização da IA em suínos é importante que sejam otimizados os animais cujos espermatozoides tenham maior resistência ao acondicionamento, minimizando riscos na hora da fertilização (REIS, 2002).

Para suprir a demanda de ejaculados para a produção de DI nas centrais, os animais são altamente exigidos desde o princípio da vida reprodutiva, o que interfere no intervalo entre as coletas, fator que também contribui para a motilidade dos espermatozoides devido ao menor tempo para espermiogênese e maturação dos gametas. Conforme Dornelles et al. (2019), embora os animais em CPS tenham menor intervalo entre coletas nesse período, esse fator não interfere no uso dos ejaculados, corroborando com Bortolozzo et al. (2005), em que os parâmetros devem ser de no mínimo 70% de Motilidade Total (MT) e máximo de 20% de defeitos morfológicos.

#### **2.4.2 Temperatura e período de armazenagem**

A IA é uma técnica aplicada em suínos de granjas de todo o mundo, com o uso de sêmen de animais geneticamente superiores, visando o melhoramento animal e aumentando a produtividade do plantel. As DI produzidas são acondicionadas no estado líquido, em temperaturas que variam de 15°C a 18°C para minimizar o metabolismo, diminuir o consumo de substrato e permitir uma durabilidade de até 7 dias (BIANCHI et al., 2011). Entre faixas de temperatura que vão de 25°C a 5°C, ocorre a redução da fluidez dos lipídeos na membrana do espermatozoide suíno, fato que explica sua maior sensibilidade ao resfriamento. Além disso, na conservação inferior a 15°C, acentua-se a redução da motilidade (RONDON et al., 2012).

A criopreservação, outra técnica que pode ser usada para a conservação do sêmen, é pouco utilizada em níveis de alta produção pelo custo de confecção, tempo envolvido em sua preparação e baixa resistência espermática ao congelamento. Estudos demonstraram que doses refrigeradas geram bons resultados zootécnicos, semelhantes aos obtidos com a monta natural, o que dispensa o uso da criopreservação na rotina das centrais (BIANCHI et al., 2011). A técnica de congelamento interfere, além dos parâmetros de motilidade e viabilidade, também a integridade da membrana do espermatozoide. Entretanto, o uso dessa técnica é valioso em casos que se deseje a conservação dos recursos genéticos ou para a garantia de um fornecimento

comercial constante de DI no caso de um problema epidemiológico temporário ou de diminuição da produção de sêmen (RONDON et al., 2012).

Teles et al. (2016), relatam que a célula espermática permanece viável por até 72 horas se diluída e acondicionada refrigerada, tempo esse que se excedido pode ocasionar piora na qualidade das DI, principalmente por danos à membrana celular causados pelas ROS. Katzer et al. (2004), citam que a motilidade espermática pode ser comprometida se estendido o tempo de acondicionamento das DI, visto que na temperatura de armazenagem o metabolismo é minimizado, não cessando o consumo de energia, além de acumular metabólitos tóxicos ao gameta, o que interfere em sua durabilidade e fertilidade. Ademais, o resfriamento de sêmen a 15°C - 18°C não impede a proliferação bacteriana da flora animal, o que ocasiona a competitividade por substrato pelos micro-organismos e células reprodutivas, piorando a qualidade das doses.

#### **2.4.2 Meios diluidores**

O sucesso da IA se deve à viabilidade dos espermatozoides suínos no período de acondicionamento, bem como no momento da introdução no trato reprodutivo da fêmea. Para isso são utilizados extensores de sêmen que têm por função a capacidade de conservar os espermatozoides durante sua estocagem (VASCONCELOS et al., 2001), fornecendo energia suficiente para que mantenham a capacidade de fecundação. Além disso, sua função também envolve o aumento do volume total da amostra, proteção das células contra o choque térmico, controle de pH e osmolaridade e inibir o crescimento de bactérias através da incorporação de antibióticos em seu meio, bem como uso de antioxidantes exógenos (MARTINS, 2015).

Conforme Katzer et al. (2004), existem no mercado três categorias de extensores de sêmen, sendo curta duração (3 dias), média (5 dias) e longa duração (7 dias). Segundo os autores o *Beltsville Thawing Solution* (BTS), considerado diluente de curta duração, tem sido o mais utilizado nas CPS devido a facilidade de fabricação e baixo preço de comercialização. Porém, tem-se usado os de longa para evitar a realização de coletas e processamento de sêmen nos finais de semanas e minimizar também o custo de transporte para o produtor, pelo fato de que um maior número de doses pode ser adquirido por uma única entrega (LEVIS, 2000).

## 2.5 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (ROS) PELO ESPERMATOZOIDE

As ROS são metabólitos com número ímpar de elétrons na camada de valência, sendo altamente energéticos e instáveis. Fisiologicamente no organismo, quando ocorre metabolismo aeróbio do Oxigênio ( $O_2$ ), cerca de 98% dele é reduzido, formando água na cadeia respiratória por meio do transporte de elétrons na mitocôndria. Através do sistema enzimático citocromo, que exerce a fosforilação oxidativa no retículo endoplasmático, procede a redução tetravalente do oxigênio com aceitação de quatro elétrons. Através desse processo o  $O_2$  é reduzido cerca de 5%, onde uma molécula recebe apenas um elétron, originando intermediários altamente reativos nomeados de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) que são tóxicas ao organismo quando em demasia. São exemplos destes radicais os Superóxidos ( $-O_2$ ), Hidroxila ( $-OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), este último com maior toxicidade à célula espermática (TONIOLLI; COSTA, 2017).

Maia e Bicudo (2010), descrevem a formação dos radicais  $-O_2$ ,  $-OH$  e  $H_2O_2$ , onde o primeiro é gerado por meio da cadeia respiratória de forma espontânea na membrana mitocondrial, além das flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases. Por ser um radical livre formado a partir de oxigênio molecular, pela adição de um elétron, é pouco reativo e não possui capacidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo localmente na região que é produzido. Outro radical, este o mais reativo de todos em sistemas biológicos, o radical  $-OH$ , é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais ( $Fe^{++}$  ou  $Cu^+$ ), denominada reação de Fenton, reagindo de imediato com biomoléculas, onde desencadeia a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares. Por não ser um radical livre e, assim, confirmando que nem toda espécie reativa o deve ser, o  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio, extremamente tóxico às células, participando como intermediário na reação que produz o radical  $-OH$ . Sua origem vem da dismutação enzimática do  $O_2^-$  pela enzima superóxido dismutase, com vida longa e capacidade de atravessar membranas biológicas.

A membrana plasmática, mitocôndrias e citoplasma dos espermatozoides são os principais responsáveis pela geração de espécies reativas no meio espermático e podem ser favorecidos pela presença de íons ferro e cobre, através das reações de Fenton. Ambos metais de transição reagem com o  $H_2O_2$  formando complexos intermediários, que em seguida se decompõem formando o radical  $-OH$  (AGUIAR et al., 2007). As ROS são formadas no plasma seminal principalmente por células espermáticas imaturas, morfológica ou funcionalmente anormais e leucócitos que podem estar presentes. Os espermatozoides são muito sensíveis aos

danos oxidativos por apresentarem na constituição de suas membranas grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, o que os torna susceptíveis à peroxidação lipídica (RIGO, 2016).

Em concentrações fisiológicas as ROS atuam na capacitação espermática e sua hiperativação, na reação acrossomal e na interação espermio-ocitária. Quando a homeostase entre ROS e agentes antioxidantes naturais presentes no plasma seminal é quebrada, ações deletérias ocorrem no sêmen e, para evitá-las, antioxidantes exógenos são utilizados a fim de combater seu excedente. Nos suínos observa-se alto grau de peroxidação lipídica nas células espermáticas devido à baixa capacidade antioxidante do sêmen, induzindo danos a sua membrana, ao DNA e apoptose de espermatozoides (RIGO et al., 2017).

## 2.6 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O termo antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação daquele substrato. Fisiologicamente, os antioxidantes convertem as ROS em água para prevenir seu excesso no meio (ANDRADE et al., 2010). Podem ser compostos por vitaminas, minerais, enzimas, pigmentos naturais e outros compostos vegetais, com objetivo principal de inibir a oxidação de estruturas celulares. Existem dois sistemas de defesa antioxidante, os enzimáticos, também chamados de naturais, e os não enzimáticos ou sintéticos que, muitas vezes, são suplementados na dieta. Os primeiros, compostos pelo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), são os que atuam fisiologicamente no organismo no auxílio à manutenção da homeostase celular contra a carga de ROS (MAIA e BICUDO, 2009). Os segundos, compostos de baixo peso molecular, incluem o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido  $\alpha$ -lipoico, albumina, taurinas, hipotaurinas e compostos fenólicos (MARTINS, 2015).

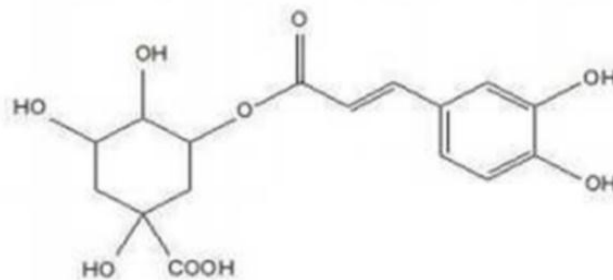
Conforme Martins (2015), ao ser processado para o armazenamento o sêmen suíno perde parte da capacidade antioxidante protetora dos espermatozoides, que ficam susceptíveis aos danos causados pelas ROS, devido a diluição do plasma seminal. Por isso, para otimizar estas células reprodutivas, diversas pesquisas com adição de antioxidantes aos extensores têm sido feitas, visando a manutenção de sua capacidade fecundante através da diminuição da peroxidação lipídica celular. Os principais antioxidantes adicionados aos diluidores de sêmen

incluem a vitamina C, E e compostos fenólicos, como é o caso do ácido clorogênico. A vitamina C tem característica hidrossolúvel, atuante na redução de moléculas oxidativas como os peróxidos, prevenindo a elaboração de hidroperóxidos de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas (VALENÇA; GUERRA, 2007). Por sua vez, a vitamina E, com característica lipossolúvel, é capaz de suprimir a peroxidação lipídica pela captura de radicais peroxila presentes no meio seminal (LABÊTA et al., 2017).

## 2.7 ÁCIDO CLOROGÊNICO

Alternativas para reduzir a quantidade de radicais livres que inevitavelmente é gerada no meio seminal devido a oxidação de estruturas dos espermatozoides estão sendo estudadas, como é o caso da adição ao seu plasma de antioxidantes exógenos, com o intuito de neutralizar o excesso de ROS. Os diluentes possuem a si incorporados antioxidantes exógenos, porém estes oxidam rapidamente e reduzem o seu efeito. Uma possível substância a ser utilizada é o ácido clorogênico (*Chlorogenic Acid* - ChA) (Figura 4), por conter em suas características a propriedade antioxidante necessária para manutenção da homeostase no plasma seminal (PEREIRA, 2014).

Figura 4 - Estrutura química do Ácido Clorogênico (Ácido 5-cafeoilquínico).



Fonte: Pereira (2014).

A ação antioxidante do ChA já foi reconhecida por Pereira et al. (2018), sendo um composto fenólico associado à composição do café e outros alimentos, demonstrando potencial na capacidade de reduzir danos ao DNA em células humanas. Conforme Teles et al. (2016), é uma substância com propriedades antioxidantes, capaz de neutralizar o efeito de radicais livres,



como as ROS, formadas no sêmen pela peroxidação lipídica de espermatozoides, potencializando os antioxidantes naturais do meio seminal. Nguyen et al. (2017), utilizaram esta mesma substância para avaliar seu efeito antioxidante, usando-a na suplementação durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos, onde o resultado foi satisfatório quanto ao estresse oxidativo, protegendo as células reprodutivas de danos ao DNA. Sua função biológica está ligada não somente à atividade antioxidante, mas também às ações antimicrobianas, anticarcinogênicas e hipoglicemiantes (XAVIER, 2017).

Teles et al. (2016), desenvolveram um experimento utilizando a casca do café como cobertura nas baias de varrões, buscando resultados quanto à possíveis melhorias na viabilidade espermática, devido à presença de ChA em sua constituição. Constataram que a presença dessa cama não influenciou significativamente o volume de ejaculado ou a concentração, mas diminuiu a motilidade do sêmen fresco. Contudo, após a diluição, não apresentou alterações significativas nas características de motilidade espermática quando comparado ao grupo controle, imediatamente após a diluição ou após 96 horas de armazenamento.

Em seu estudo, Namula et al. (2018), suplementaram o diluidor de sêmen suíno para congelamento com ChA e Ácido Caféico (AC), em diferentes concentrações, a fim de testar sua propriedade antioxidante em resultados após o descongelamento, por meio da avaliação da penetração destas células em oócitos. Em resultado à sua pesquisa, obtiveram a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de ChA ou AC adicionados ao extensor que favoreceu a motilidade espermática pós-descongelamento, viabilidade e integridade de membrana plasmática, não afetando a integridade de acrossoma, a fertilização e o desenvolvimento embrionário.

## 2.8 TESTES DE VIABILIDADE NA CÉLULA ESPERMÁTICA

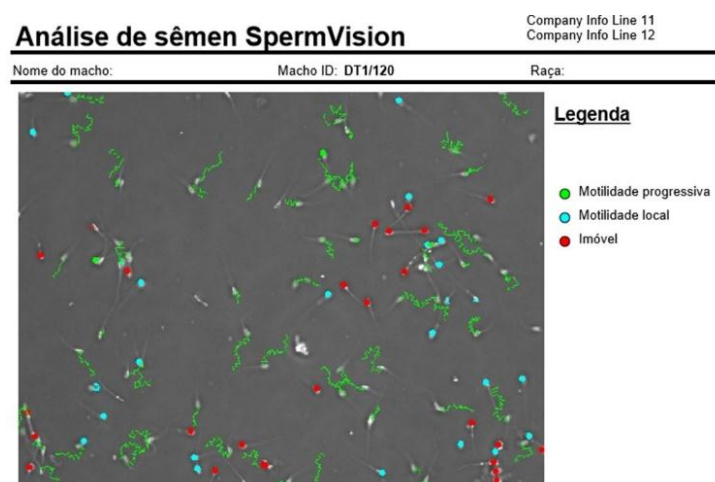
Técnicas modernas são estudadas para a avaliação da qualidade espermática, com o intuito de minimizar a subjetividade que os testes apresentam, buscando melhorar a predição da fertilidade do ejaculado de cada animal. Para determinar a capacidade fecundante da célula reprodutiva utiliza-se a avaliação de determinados parâmetros, como é o caso da integridade e funcionalidade da membrana plasmática. Essa pesquisa minuciosa em estruturas celulares é fundamental para o espermatozoide, pois ele necessita sofrer reação acrossomal e hiperativação em sua membrana para que possa adentrar ao ovócito (DE ANDRADE et al., 2007). Para tais avaliações, existem testes de morfologia espermática, teste de termo resistência e citometria de fluxo que podem ser executados durante o período de sua conservação com auxílio de um programa de computador específico, denominado *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA).

### 2.8.1 Computer Assisted Sperm Analysis (Sistema CASA)

Conforme Matos et al. (2008), logo ao início dos anos 40, estudiosos movidos pela necessidade de obter dados objetivos quanto às avaliações espermáticas, principalmente ao que se refere à porcentagem de espermatozoides móveis, bem como a velocidade e tipo dos movimentos dessas células, desenvolveram um método com o uso de fotografias em tempo real, por meio de iluminação de campo escuro, gerando assim imagens da trajetória do movimento dos gametas e, de maneira manual, determinar a velocidade de deslocamento. Porém, este sistema e demais elaborados nesse período não tinham capacidade de mensuração da velocidade individual das células. Isso foi possível no ano de 1978, através da construção de um sistema automático que era capaz de avaliar além da concentração, a trajetória do movimento celular individual.

O sistema CASA realiza a captação de imagens em tempo real por meio de uma câmera acoplada em microscópio óptico e, através de um *software*, faz a leitura automaticamente, processa leitura automática, de forma precisa da cinética individual de cada espermatozoide (Figura 5). É um sistema de eleição ao que se refere em praticidade e objetividade nos resultados, tanto para o meio científico quanto para as CPS, que demandam de agilidade em curto período para a avaliação dos ejaculados coletados (MELLAGI et al., 2019).

Figura 5 - Imagem captada pelo sistema CASA (SpermVision) e classificada quanto aos movimentos espermáticos.



Fonte: ACSURS (2019).

Uma particularidade sua é a capacidade de caracterizar subpopulações de células, por meio de associações de padrões de cinética espermática. Podem ser analisados, portanto, gametas hiperativados, através do aumento da velocidade curvilínea (VCL) e da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), característica própria da célula reprodutiva masculina que, ao hiperativar-se no trato reprodutivo da fêmea, adquire movimentação não linear (ANDRADE et al., 2017).

Ao que se refere à maximização da produção de DI, o uso do sistema CASA tem se tornado essencial, otimizando as células viáveis presentes em cada ejaculado, aumentando a produção da Central para atender a todas as fêmeas que venham a ser inseminadas. Cada vez mais é exigido desse *software*, desenvolvendo novos parâmetros avaliados, tais como a morfometria do espermatozoide, alguns com capacidade de medir cada estrutura mínima da célula, como o núcleo, peça intermediária, acrossoma e cauda (VALVERDE et al., 2019).

### **2.8.2 Morfologia espermática**

A avaliação da morfologia espermática é cada vez mais utilizada nos laboratórios das CPS devido sua importância como indicador de fertilidade do ejaculado, tanto na espécie humana como em animais, podendo também demonstrar danos celulares causados por agentes físicos ou químicos (MATOS et al., 2008). Alguns *softwares* do sistema CASA possuem a morfologia como adicional, além de avaliar motilidade e concentração, a fim de minimizar a subjetividade da avaliação morfológica da estrutura espermática (ANDRADE et al., 2017).

Conforme Bortolozzo et al. (2005), as anormalidades da célula espermática podem ser divididas conforme sua origem, ou seja, classificadas em primárias, secundárias e terciárias. Os autores citam que as anormalidades primárias são divididas em específicas e não específicas, sendo estas últimas ligadas ao processo da espermatogênese, podendo afetar qualquer estrutura do espermatozoide. Altas porcentagens de anormalidades de cabeça (Figura 6) estão relacionadas a degenerações e hipoplasias testiculares, gerando ainda alterações cromossômicas. Defeitos específicos são raros e quase sempre de origem genética, resultando em certos casos na infertilidade ou esterilidade. São exemplos dessas anormalidades botão no acrossoma, diadema, peça intermediária em saca-rolha, dentre outros. Conforme a literatura, as anormalidades secundárias têm origem epididimária. Citam-se cabeças destacadas, caudas dobradas, defeitos de peça intermediária, etc. As anomalias terciárias são causadas por fatores mecânicos, físicos ou químicos, também chamadas de artefatos, muitas vezes confundidas com defeitos secundários, ligadas principalmente ao esfregaço.

Figura 6 - Morfologia espermática: anormalidade primária (cabeça dupla).



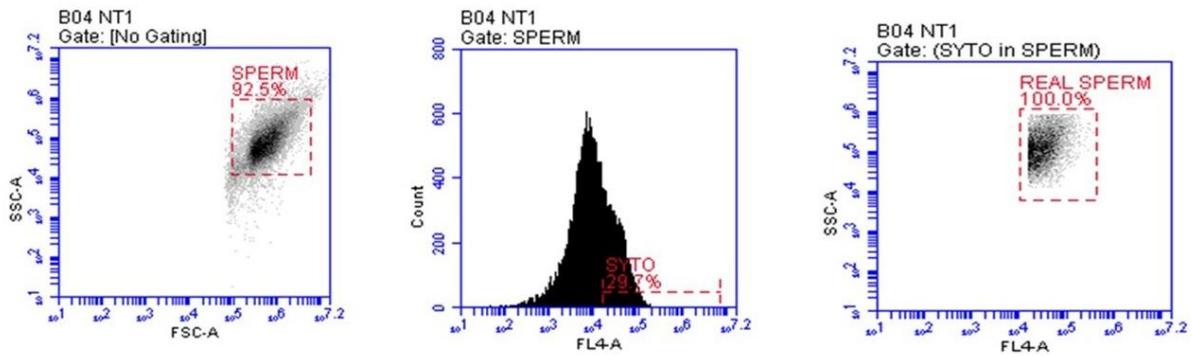
Fonte: ACSURS (2019).

### 2.8.3 Citometria de fluxo

Ao se falar sobre índice de fertilidade de espermatozoides, automaticamente deve-se recordar as funções que sua membrana plasmática exerce, mantendo-a íntegra, sem danos sofridos ao processamento do ejaculado ou durante o período de armazenamento. Para se ter conhecimento de sua integridade e, assim, predizer sua fertilidade, dispõe-se de métodos de coloração da célula, seja por meio de eosina-nigrosina ou com uso de corantes fluorescentes. Essa metodologia para classificação de células lesionadas tem por base a capacidade de membranas intactas impedirem ou não a entrada destes corantes nos compartimentos internos dos espermatozoides (BERNARDI, 2008).

Cada estrutura do gameta possui uma função específica e, ao se falar em adição de sondas fluorescentes que possam vir a corá-los, cada uma tem a especificidade de pigmentar determinada região da célula. No início dos protocolos para coloração é necessário utilizar um contra-corante (sonda SYTO), isso para que o citômetro identifique todas as células a serem analisadas, mesmo que nenhuma das outras sondas interaja com os espermatozoides. No momento da leitura feita pelo aparelho (Figura 7) é possível haver uma superestimação da amostra com partículas não espermáticas de tamanho e complexidade interna semelhantes aos espermatozoides. Para evitar esse tipo de leitura errônea, utiliza-se um tipo de sonda permeável à membrana plasmática íntegra, capaz de ligar-se seletivamente ao DNA para exclusão dessas partículas (ANDRADE et al., 2017).

Figura 7 - Gráficos gerados a partir da leitura da amostra submetida ao citômetro de fluxo.



Fonte: Laboratório de Biotecnologia da UNIVATES.

Para avaliar a integridade da membrana, a metodologia seria através do uso de uma sonda à qual essa estrutura possui baixa seletividade, sendo assim capaz de penetrar ao meio intracelular e se ligar ao DNA em casos de danos. A literatura cita a utilização do iodeto de propídio (IP) e YO-PRO-1, assim como outras sondas, cada qual com variações perante sua forma de atuação na célula e colorações. Quanto a integridade acrossomal, aplica-se sondas que interajam com sua membrana glicoproteica interna, como é o caso de algumas aglutininas, tais como a aglutinina oriunda de *Pisum sativum* (PSA). Ao se ligarem aos açúcares presentes na membrana interna do acrossoma e associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC), emite coloração verde que é lida pelo citômetro e contabilizadas as lesões (PAVANELI, 2018).

**3 ARTIGO 1 - PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE SUÍNOS COM EJACULADO SENSÍVEL AO RESFRIAMENTO APÓS A ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO**

**Parâmetros espermáticos de suínos com ejaculado sensível ao resfriamento após a adição de Ácido Clorogênico**

**Sperm parameters of pigs with ejaculate sensitive to cooling after the addition of Chlorogenic Acid**

**Rodrigo Dalmina Rech<sup>1</sup> Janine Alves Sarturi<sup>1</sup> Luara Medianeira de Lima Schlösser<sup>1</sup> Carlos Augusto Rigon Rossi<sup>2</sup> Cristian Guilherme Gräf<sup>3</sup> Analaura Bianchini Pinheiro<sup>3</sup> Anna Flávia Tischer da Silva<sup>4</sup> Ivan Cunha Bustamante Filho<sup>4</sup>**

Artigo a ser submetido a periódico científico e apresentado de acordo com as normas da ANDROLOGIA.

**Parâmetros espermáticos de suínos com ejaculado sensível ao resfriamento  
após a adição de Ácido Clorogênico**

**Rodrigo Dalmina Rech<sup>1</sup> Janine Alves Sarturi<sup>1</sup> Luara Medianeira de Lima  
Schlösser<sup>1</sup> Carlos Augusto Rigon Rossi<sup>2</sup> Cristian Guilherme Gräf<sup>3</sup> Analaura  
Bianchini Pinheiro<sup>3</sup> Anna Flávia Tischer da Silva<sup>4</sup> Ivan Cunha Bustamante  
Filho<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria - RS, Brasil. <sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Clínica de Grandes Animais da UFSM, Santa Maria - RS, Brasil. <sup>3</sup>Curso de Zootecnia da UFSM, Santa Maria - RS, Brasil. <sup>4</sup>Laboratório de Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), Lajeado - RS, Brasil. CORRESPONDÊNCIA: C. A. R. Rossi [carlos.rossi.mv@gmail.com - Tel.: (55) 3220 8469]. Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Av. Roraima, nº 1000 - Campus Universitário. Bairro Camobi, Km 9. CEP: 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil.

**Resumo:**

Objetivou-se avaliar a viabilidade de doses inseminantes de suínos com ejaculados classificados como sensíveis ao acondicionamento à 17 graus Célsius, acrescidas de ácido clorogênico e identificar qual concentração do antioxidante obteve melhor eficiência em sua conservação. Quatro animais foram pré-selecionados, de um total de 25, que obtiveram ejaculados classificados como sensíveis ao resfriamento. Estes foram coletados uma vez por semana, por quatro semana consecutivas, totalizando 4 ejaculados por animal, submetidos a cinco tratamentos, cada qual

elaborado com diluente Androstar<sup>®</sup> Plus e acrescidos de ácido clorogênico nas seguintes concentrações por dose inseminante de 45 mL: T1 - 0 µg, T2 - 1.500 µg, T3 - 3.000 µg, T4 - 4.500 µg, T5 - 6.000 µg. Realizou-se análises espermáticas de motilidade total, motilidade progressiva, motilidade local e células imóveis, teste de termo resistência, morfologia espermática, integridade de membrana espermática plasmática e acrossomal por citometria de fluxo, por período de até 168 horas. Os resultados quanto à adição do ácido clorogênico não foram relevantes quanto aos tratamentos aplicados, somente em função das horas de análise, demonstrando sua ineficiência em prolongar a viabilidade espermática nas concentrações utilizadas.

Keywords: antioxidante, acondicionamento térmico, baixa fertilidade, susceptibilidade e viabilidade espermática.

## **1 Introdução**

A inseminação artificial (IA), por ser uma biotécnica reprodutiva, visa a maximização do uso dos ejaculados (Wentz & Bortolozzo, 1998). Para seu êxito, o sêmen processado requer cuidados quanto a temperatura de armazenagem (15°C-18°C) e correta preparação do diluente para conservá-lo em condições adequadas durante a estocagem (Vasconcelos, Moraes, Moreira, Rigolon & Martins, 2001). Este último além de oferecer suporte energético às células espermáticas, provê antioxidantes exógenos com a finalidade de evitar a peroxidação lipídica pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) (Martins, 2015). É interessante salientar que a



membrana plasmática do gameta, suas mitocôndrias e seu citoplasma são os principais responsáveis pela geração de ROS no meio espermático, podendo ser favorecidos pela presença de íons ferro e cobre (Rigo, 2016).

Uma alternativa para reduzir a quantidade de radicais livres que inevitavelmente é gerada no meio seminal, é adicionar ao seu plasma antioxidantes exógenos, com o intuito de neutralizar o excesso de ROS. Uma dessas substâncias com ação antioxidante é o ácido clorogênico (ChA) (Teles et al., 2016). No entanto, os estudos e resultados encontrados na literatura em relação a utilização do ChA como meio enriquecedor do diluente espermático na elaboração de doses inseminantes (DI) são incipientes e pouco conclusivos. E ainda, nenhum trabalho foi desenvolvido com ejaculados obtidos a partir de reprodutores efetivamente sensíveis ao resfriamento espermático. Portanto, este trabalho objetivou avaliar a viabilidade espermática a partir de ejaculados de reprodutores sensíveis ao acondicionamento térmico e identificar a concentração de ChA que apresenta melhor eficiência de conservação das DI ao longo do tempo.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Delineamento experimental**

#### **2.1.2 Etapa I**

Na primeira etapa do experimento dispôs-se de 25 reprodutores suínos, da raça Agroceres 337<sup>®</sup>, com ejaculados coletados uma vez por semana, por 5 semanas

consecutivas, totalizando 5 ejaculados por animal. Os animais provinham da Central de Produção de Sêmen (CPS) da Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS), localizada no município de Estrela - RS, Brasil. Todos os procedimentos envolvidos no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob protocolo número 5128150419.

O sêmen *in natura* foi pesado e analisado quanto à motilidade e concentração de espermatozoides, pelo sistema automatizado de análise seminal Computer Assisted Sperm Analysis (CASA, AndroVision<sup>®</sup>, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), utilizando câmaras de contagem (Leja<sup>®</sup>) (MENEGAT et al., 2017). Após diluiu-se o ejaculado em Androstar<sup>®</sup> Plus (AND), (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), considerado diluente de longa ação. As DI produzidas foram diluídas de modo a conter  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides por DI de 45 mL e, posteriormente, armazenadas em conservadora, sob temperatura de 17 graus Celsius.

As DI produzidas foram analisadas quanto a Motilidade espermática Progressiva (MP) nas horas 0, 120 e 168 e classificadas em grupos, de acordo com a sensibilidade ao resfriamento, sendo maior, média e menor sensibilidade, a partir da tabulação dos dados em planilha eletrônica do Excel<sup>®</sup>. A MP obtida e tabulada permitiu classificar os reprodutores, de acordo com a literatura (REIS, 2002), em: MP < 60% em 120 horas (maior sensibilidade); MP  $\geq$  60% em 120 horas e < 60% em 168 horas (média sensibilidade) e MP  $\geq$  60% em 168 horas (menor sensibilidade). Considerou-se sensível o animal que apresentou no mínimo três dos cinco ejaculados no primeiro padrão de seleção (MP < 60% em 120 horas). Assim,

foram classificados quatro reprodutores a serem utilizados na etapa seguinte do trabalho (descrito abaixo).

### **2.1.2 Etapa II**

A segunda etapa foi constituída pela coleta de sêmen dos animais pré-selecionados (4 animais), sendo executada uma vez por semana, durante 4 semanas consecutivas e totalizando 16 ejaculados totais. Novamente produziu-se DI com AND, acrescido de ácido clorogênico (ChA - Chlorogenic acid crystalline, C3878 - Sigma-Aldrich®) nas seguintes concentrações por DI de 45 mL em cada tratamento (T): T1: AND + ChA (0  $\mu\text{g DI}^{-1}$ ) (controle); T2: AND + ChA (1.500  $\mu\text{g DI}^{-1}$ ); T3: AND + ChA (3.000  $\mu\text{g DI}^{-1}$ ); T4: AND + ChA (4.500  $\mu\text{g DI}^{-1}$ ); T5: AND + ChA (6.000  $\mu\text{g DI}^{-1}$ ). No laboratório novamente foram realizadas as análises de motilidade progressiva e total de cada amostra, nas horas 0, 120 e 168 do estudo.

## **2.2 Análises microscópicas**

As análises de integridades de membrana espermática plasmática e acrossomal foram executadas no Laboratório de Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), utilizando citômetro de fluxo BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) controlado pelo software BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA), conforme descrito na literatura (De Andrade et al., 2007; De Andrade et al., 2011). Foi realizado ainda o Teste de Termo Resistência (TTR) nas horas 120 e 168 e morfologia espermática nas horas 0, 120

e 168 de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

### **2.3 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Minitab 16. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. A partir deste, os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM em nível de 5% de significância. Os efeitos incluídos no modelo analítico (quando presentes), foram os tratamentos (T) avaliados, as semanas (S) de análise, as horas de análise (H), os minutos de análise (Mi) e as interações T\*H e T\*Mi. As eventuais diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* em nível de 5% de significância.

## **3 Resultados**

Os dados analisados diferiram quanto a MT (Figura 1) nos tratamentos T1 e T4, sendo T1 4,43% superior ( $p < 0,05$ ) em relação a T4. As MP e ML não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre si quanto aos tratamentos utilizados. Em relação à IM, o T4 foi 17,21% superior ( $p < 0,05$ ) se comparado ao T1. Ao utilizar as horas de avaliação no modelo estatístico, observamos que a MT e MP apresentaram um decréscimo ( $p < 0,05$ ) de 18,52% e 22,84%, respectivamente, no decorrer das horas H0 até H168. O efeito inverso foi observado nas variáveis ML e

IM, as quais apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) de 22,95% e 64,19%, respectivamente, entre as H0 e H168.

No TTR a variável MT (Figura 2) obteve diferença entre os tratamentos T1 e T4, sendo T1 7,86% maior ( $p < 0,05$ ) que T4. Os dados de MP e ML não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) nesta análise. Novamente, na variável IM, os valores de T1 e T4 diferiram, sendo T4 17,98% maior ( $p < 0,05$ ), que T1. Quanto as horas de avaliação do TTR, a MT decresceu ( $p < 0,05$ ) 3,87% da H120 para H168, enquanto a IM aumentou ( $p < 0,05$ ) 8,89% referente ao mesmo período. Os minutos avaliados neste teste apresentaram diferenças em todas as variáveis, sendo que a MT diminuiu ( $p < 0,05$ ) 13,47% do minuto 30 (30') em relação ao minuto 120 (120'). Da mesma forma, a MP diminuiu ( $p < 0,05$ ) 26,82% do 30' para o 120', ML aumentou ( $p < 0,05$ ) 43,38% do 30' para o 120' e IM aumentou ( $p < 0,05$ ) 29,09% do 30' para o 120'.

Os dados referentes a morfologia espermática (Tabela 1) não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) em relação aos tratamentos utilizados, mas sim nas horas de avaliação, sendo que as alterações primárias (PR) mostraram maiores diferenças ( $p < 0,05$ ) na H0 68,97% em relação a H120 e 31,16% em relação a H168. A variável IN também não obteve diferenças, sendo 20,45% maior ( $p < 0,05$ ) na H120 em relação a H0 e 11,91% em relação a H168.

As integridades de membrana plasmática espermática e acrossomal (Tabela 2) não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) em relação aos tratamentos utilizados. De maneira geral, ao que se refere às horas de análise, observamos que AIML e ARMI não diferiram ( $p > 0,05$ ) da H0 para H168, enquanto que os valores de

ARML e AIMI obtiveram diferenças neste período, sendo H0 63,27% maior ( $p < 0,05$ ) que H168 e H168 3,57% maior ( $p < 0,05$ ) que H0, respectivamente.

#### **4 Discussão**

Os resultados obtidos em relação às motilidades espermáticas em cada tratamento utilizado, permitiu-nos observar que nenhuma das concentrações de ChA utilizadas como meio enriquecedor do diluente e usadas na elaboração de DI foram eficientes como melhoradoras de sua conservação. Ademais, houve piora na MT nos tratamentos se comparados ao controle, onde a concentração de 4.500  $\mu\text{g/DI}^{-1}$  (T4) obteve motilidade inferior as demais, sugerindo sua ação deletéria ao acondicionamento do sêmen. Concomitante a isso, T4 se sobressaiu quanto a IM, comprovando o explícito anteriormente.

Resultados que divergem de nosso estudo foram encontrados por Pereira et al. (2017), os quais obtiveram em seu estudo uma concentração específica de ChA ( $3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) que surtiu resultado positivo em relação aos demais tratamentos empregados, porém em sêmen armazenado por até 24 horas, sendo necessária concentrações maiores para períodos de tempo superiores de acondicionamento. Do ponto de vista da produção animal, torna-se inviável a adição de concentrações maiores de ChA, pela relação de custo/benefício da produção de DI. Isto poderá encarecer ainda mais o custo de elaboração da DI, portanto, o produto final que é o suíno.

Por não haver melhora na motilidade das células espermáticas nos tratamentos avaliados, as variações do ponto de vista fisiológico foram observadas

em relação as horas de avaliação, pois houve redução do percentual de motilidade e aumento de células imóveis ao decorrer do tempo de armazenamento. Toniolli e Costa (2017), explicam que as ROS podem influenciar nestes resultados, pois, com o passar do tempo, através principalmente do metabolismo mitocondrial são produzidas quantidades excessivas de radicais livres que vem a lesionar a membrana plasmática dos espermatozoides e danificar sua capacidade fecundante.

Os resultados do TTR não foram os esperados, visto a interferência negativa do ChA nas concentrações empregadas, onde T4 obteve resultados piores que os demais tratamentos. São poucas as explicações cabíveis na literatura, entretanto, Martin-Hidalgo et al. (2013), relatam que algumas doses desse composto reduzem a funcionalidade da membrana mitocondrial por meio do bloqueio da cadeia respiratória, induzindo a perda da função celular. O decréscimo da motilidade no decorrer de H120 até H168 era esperado, uma vez que a literatura cita que a redução de motilidade espermática possa ocorrer pelo metabolismo espermático e formação de ROS (Toniolli, 2012), assim como nos minutos de avaliação, pois, o consumo de substrato energético obtido com base no plasma seminal pode ser utilizado ao longo das horas de avaliação.

Pereira et al. (2017), relatam que a ação do ChA como antioxidante no sêmen suíno é reduzida após 72 horas de acondicionamento, baseados nos resultados da concentração de malondialdeído (MDA), que aumenta ao passar do tempo de armazenamento. Citam ainda que o ChA pode alterar o controle fisiológico do potencial redox celular, que afeta a regulação do metabolismo geral da célula, impacta no desequilíbrio metabólico e afeta a motilidade espermática. Porém esses efeitos são transitórios, até que a célula adquira homeostasia com a

presença do ChA. Em seu estudo, os autores comentam que o próprio ChA desempenhou ação mais potente do que a própria vitamina E, em 72 horas de resfriamento.

A morfologia espermática é uma ferramenta auxiliar para detecção de possíveis animais com baixa fertilidade no plantel de reprodutores de uma Central, baseado em altas contagens de espermatozoides morfologicamente anormais ou altas incidências de um único defeito, os quais podem indicar a redução da fertilidade dos varrões. Por se tratar de uma avaliação subjetiva, envolvendo o sucesso da preparação do esfregaço e do treinamento do observador, é uma técnica não muito utilizada na rotina de CPS e, embora apresente grande validade, ela não é capaz de mensurar a funcionalidade na célula espermática (DeArruda et al., 2011). Neste estudo, ao se tratar da escolha de animais com ejaculado de maior sensibilidade ao resfriamento, houve maior incidência de defeitos celulares primários se comparado aos demais, porém, as células íntegras ainda continuaram prevalecendo como totalidade no esfregaço, condizendo com a permanência dos animais no plantel de reprodução. Conforme Bortolozzo et al. (2005), os defeitos primários envolvem principalmente alterações de cabeça dos espermatozoides, de origem intra-gonadal, ou seja, indicam problemas na espermatogênese, podendo estar relacionado a degenerações e hipoplasias testiculares.

Pode-se perceber que quanto a integridade de membrana plasmática e acrossomal, a adição de ChA também demonstrou ser ineficaz nas concentrações utilizadas, havendo alterações somente quanto as horas de avaliação. Quanto a essas, a maior proporção de ARML na H0 pode indicar maior grau de lesão no acrossoma e membrana plasmática que, segundo Tanno (2009), as deteriorações



das membranas espermáticas sugerem a subfertilidade ou até mesmo infertilidade de machos reprodutores. Pode-se frisar ainda a escolha de animais com baixa fertilidade no plantel da Central para a execução do estudo, que explicam estes resultados, a partir da afirmativa de que reprodutores potencialmente férteis talvez não necessitem da adição de antioxidantes no ejaculado, visto seu grande potencial intrínseco na manutenção da viabilidade das DI produzidas. Por isso, podemos estimar que mesmo ao utilizar reprodutores específicos com inferior desempenho quanto a sensibilidade ao resfriamento das doses e a adição de antioxidante para sua melhoria, nas concentrações utilizadas nesse experimento não apresentaram os efeitos esperados.

A adição de ácido clorogênico, nas concentrações utilizadas, como meio enriquecedor aos diluentes para elaboração de doses inseminantes de varrões, considerados sensíveis ao acondicionamento térmico, não apresenta benefícios em prolongar a viabilidade espermática. Ainda, não houve melhora quanto a morfologia espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal ao final de 168 horas de armazenamento a 17 graus Celsius.

## **AGRADECIMENTOS**

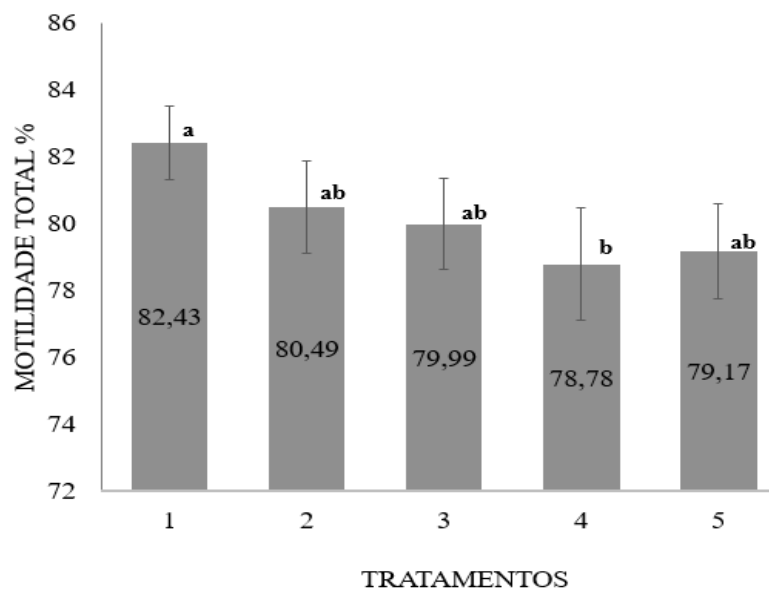
Os autores agradecem a Central de Produção de Sêmen (CPS) da Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS); ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES); e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

## Referências

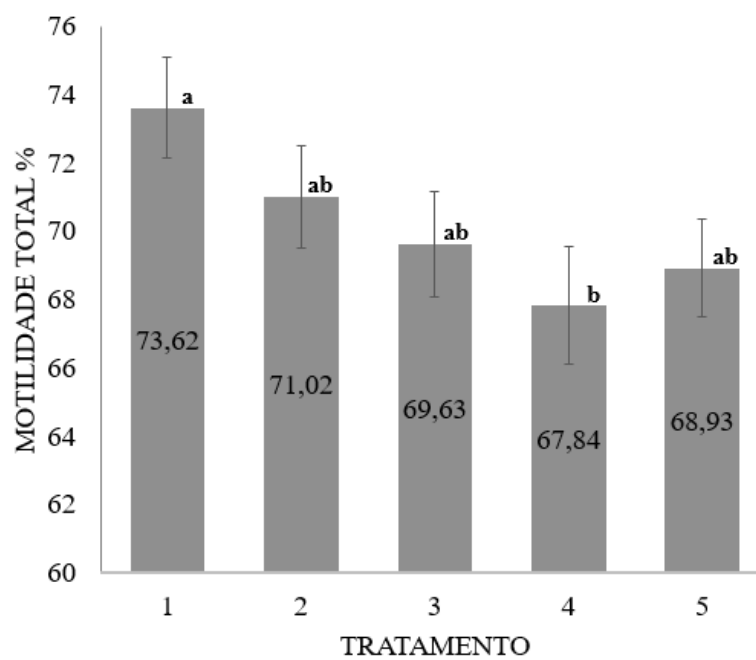
- Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., Alonso, M. A., Carvalho, H. F., Oliveira, L. Z., Nascimento, J., Silva, D. F., Affonso, F. J., Lemes, K. M., & Jaimes, J. D. (2011). Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(2), 145-151.
- Bortolozzo, F. P., Wentz, I., Ferreira, F. M., Bennemann, P. E., & Bernardi, M. L. (2005). *Exame do ejaculado*. In: F. P. Bortolozzo, I. Wentz, P. E. Bennemann, M. L. Bernardi, E. B. Wollmann, F. M. Ferreira, G. Borchardt Neto. (2005). *Suinocultura em Ação: inseminação artificial na suinocultura tecnificada* (pp. 69-89). Porto Alegre: Editora Pallotti.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. (2013). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA.
- DeAndrade, A. F. C., Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., Nascimento, J., Martins, S. M. M. K., Raphael, C. F., & Moretti, A. S. (2007). Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reproduction in domestic animals*, 42(2), 190-194.
- DeAndrade, A. F. C., Zaffalon, F. G., Celeghini, E. C. C., Nascimento, J., Tarragó, O. F. B., Martins, S. M. M. K., Alonso, M. A., & Arruda, R. P. (2011). Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? *Reproduction in Domestic Animals*. 46(4), 682-686.
- Martin-Hidalgo, D., Llera, A. H., Henning, H., Wallner, U., Waberski, D., Bragado, M. J., Gil, M. C., & Garcia-Marin, L. J. (2013). The effect of resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17°C. *Journal of Agricultural Science*, 5(8), 231-242.
- Martins, VED. (2015). *Viabilidade do Sêmen Suíno Resfriado a 15°C Adicionado de Antioxidantes*. Dissertação. Universidade Estadual do Maranhão. Centro de Ciências Agrárias - CCA. Curso de Mestrado em Ciência Animal - CMCA. São Luís - MA.
- Menegat, M. B., Mellagi, A. P. G., Bortolin, R. C., Menezes, T. A., Vargas, A. R., Bernardi, M. L., Wentz, I., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F., & Bortolozzo, F. P. (2017). Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. *Animal Reproduction Science*, 179(1), 67-79.
- Pereira, B. A., Chaves, B. R., Teles, M. C., Pontelo, T. P., Oliveira, C. R., Souza, R. V., Rodríguez-Gil, J. E., & Zangeronimo, M. G. (2018). Chlorogenic acid improves the quality of boar semen subjected to cooled storage at 15°C. *Andrologia*, 50(5), 1-8.

- Reis, GR. (2002). *Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético*. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Rigo, VHB. (2016). *Influência do Resveratrol na Qualidade e na Fertilidade do Espermatozoide Suíno Refrigeração entre 15-17°C por 72 horas para Inseminação Artificial Intrauterina*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. Pirassununga.
- Teles, M. C., Pereira, B. A., Rocha, L. G. P., Resende, C. O., Rodrigues, V. V., Pereira, L. J., Rodríguez-Gil, J. E., & Zangeronimo, M. G. (2016). Semen quality and reproductive performance of boars kept in pens containing conventional coffee husk as a floor covering. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(7), 365-371.
- Toniolli, R. (2012). Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. *Ciência Animal*. 22(1), 365-375.
- Toniolli, R., & Costa, J. M. S. (2017). Espécies reativas ao oxigênio, antioxidantes e suas implicações na qualidade do sêmen criopreservado de mamíferos domésticos. *Investigação*, 16(8), 22-29.
- Tanno, PH. (2009). *Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Wentz, I., & Bortolozzo, F. P. (1998). Inseminação artificial em suínos. In *Suinocultura intensiva: Produção, manejo e saúde do rebanho* (pp. 209-220). Brasília: Serviço de Produção de Informação.
- Vasconcelos, A. M. M. A., Moraes, G. V., Moreira, I., Rigolon, L. P., & Martins, E. N. (2001). Características espermáticas de sêmen resfriado de suíno e conservado em diferentes diluentes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(2), 394-401.

**Figura 1:** Motilidade Total das doses inseminantes com a adição de Ácido Clorogênico.



**Figura 2:** Motilidade Total a partir do teste termo resistência das doses inseminantes com adição de Ácido Clorogênico.



**Tabela 1:** Média  $\pm$  erro padrão da morfologia espermática (alterações primárias, secundárias, terciárias e células íntegras)<sup>1</sup>

Variáveis	Tratamentos					Horas			Probabilidades			
	1	2	3	4	5	0	120	168	T	H	S**	T*H
PR	17,11 $\pm$ 3,19	15,84 $\pm$ 3,14	17,22 $\pm$ 3,19	16,54 $\pm$ 3,35	15,31 $\pm$ 3,13	24,62 $\pm$ 3,17 <sup>a</sup>	7,64 $\pm$ 1,04 <sup>b</sup>	16,95 $\pm$ 2,31 <sup>c</sup>	0,98	0,0001	0,000	1,00
SE	13,05 $\pm$ 0,91	12,69 $\pm$ 0,85	12,76 $\pm$ 0,87	12,50 $\pm$ 0,94	13,01 $\pm$ 1,02	12,00 $\pm$ 0,73	12,87 $\pm$ 0,69	13,54 $\pm$ 0,69	0,99	0,322	0,004	1,00
TE	0,41 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,06	0,07	0,292	0,0001	0,55
IN	69,29 $\pm$ 3,25	71,13 $\pm$ 3,16	69,75 $\pm$ 3,21	70,64 $\pm$ 3,29	73,33 $\pm$ 3,42	63,16 $\pm$ 2,98 <sup>b</sup>	79,39 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>	69,94 $\pm$ 2,63 <sup>b</sup>	0,89	0,0001	0,000	0,99

T=tratamentos; S=semanas de análise; H=horas de análise; PR=alterações morfológicas primárias; SE=alterações morfológicas secundárias; TE=alterações morfológicas terciárias; IN=células íntegras; T\*H=interação entre tratamentos e horas de análise. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). \*Valores expressos em porcentagem (%). \*\*Equações de regressão para semanas de análise: S = 2,79 - 0,0174 PR; S = 2,50 + 0,0002 SE; S = 2,70 - 0,720 TE; S = 1,21 + 0,0182 IN. <sup>1</sup> Avaliações de acordo com dados de literatura (Donadeu, 2004).

**Tabela 2:** Média  $\pm$  erro padrão da integridade de membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo, considerando células com acrossoma íntegro e membrana lesada (AIML), acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), acrossoma íntegro e membrana íntegra (AIMI) e acrossoma reagido e membrana íntegra (ARMI), nas horas 0, 120 e 168 de análise.

Variáveis	Tratamentos					Horas			Probabilidades	
	1	2	3	4	5	0	120	168	T	H
AIML	8,29 $\pm$ 1,36	8,33 $\pm$ 1,37	8,06 $\pm$ 1,34	8,15 $\pm$ 1,21	10,37 $\pm$ 2,05	12,89 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>	4,57 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	8,46 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	0,80	0,001
ARML	11,42 $\pm$ 1,37	11,64 $\pm$ 1,87	10,92 $\pm$ 1,82	11,51 $\pm$ 2,23	14,86 $\pm$ 2,23	15,11 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>	15,53 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>	5,55 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>	0,53	0,0001
AIMI	52,44 $\pm$ 2,62	52,00 $\pm$ 3,77	52,23 $\pm$ 3,44	53,73 $\pm$ 3,94	43,92 $\pm$ 4,42	54,41 $\pm$ 2,90 <sup>a</sup>	41,76 $\pm$ 1,97 <sup>ab</sup>	56,42 $\pm$ 2,84 <sup>b</sup>	0,29	0,0001
ARMI	27,60 $\pm$ 3,00	27,77 $\pm$ 3,83	27,44 $\pm$ 3,89	25,58 $\pm$ 4,00	27,60 $\pm$ 4,72	16,62 $\pm$ 2,76 <sup>b</sup>	37,93 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	27,05 $\pm$ 3,79 <sup>b</sup>	0,99	0,0001

T=tratamentos; C=Controle; H=horas; <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). \* Valores expressos em porcentagem (%)

#### 4 CONCLUSÃO

Pode-se perceber com o estudo a interferência causada pelas espécies reativas ao oxigênio no meio espermático, no decorrer do tempo de armazenamento das doses inseminantes. Sua formação não pode ser evitada, visto que o acondicionamento à 17°C somente minimiza o metabolismo dos gametas, não impedindo o estresse oxidativo, que pode ser minimizado usando antioxidantes exógenos ao diluente, como visto nas literaturas de referência. Entretanto, a adição de ácido clorogênico, nas concentrações utilizadas nesta pesquisa, como meio enriquecedor aos diluentes para elaboração de doses inseminantes de varrões, considerados sensíveis ao acondicionamento térmico, não apresenta benefícios em prolongar a viabilidade espermática. Ainda, não houve interferência positiva quanto a morfologia espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal ao final de 168 horas de armazenamento a 17 graus Celsius. O estudo serve como base à novas pesquisas, buscando a adaptação da solução como meio enriquecedor do diluente e talvez ser compatível com a utilização em escala industrial.



## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/22.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

ALVARENGA, A. L. N.; MURGAS, L. D. S.; ZANGERONIMO, M. G. Tipos e volumes de diluentes para inseminação artificial intrauterina em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v. 38, n. 10, p. 1886-1892, 2009. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/revista/artigos/8043.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2019.

ANDRADE, A. F. C. de; PASSARELLI, M. da S.; TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; MARTINS, S. M. M. K. Avaliação da qualidade do sêmen de cachacos: o que é possível ser feito? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte - MG, v. 41, n. 1, p. 283-291, jan./mar., 2017. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/p283-291RB654.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte - MG, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n2/p79-86.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2020.

ARAÚJO, A. M. S. Plasma seminal (revisão). **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 18, p. 2173-2291, setembro, 2014. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/artigo/1448/plasma-seminal-revisatildeo>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 1, p. 5-16, 2008. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/18780/000641743.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

BIANCHI, I.; MADEIRA, E. M.; SCHNELDER, A.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, E. K.; LUCIA JR, T.; CORRÊA, M. N. Efeitos de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre - RS, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2011. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/2890/289022244010.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2020.

BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W. V.; YESTE, M. **Boar Reproduction**. 1. ed. Berlin: Springer, 2013. 632 p.

BORTOLOZZO, F. P. et al. **Exame do ejaculado**. p. 69 - 90. In.: Bortolozzo, F. P. et al. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Editora Pallotti, 2005.

CANDINI, P. H.; VIANA, C. H. C.; MADUREIRA, E. H.; ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPCÃO, M. E. O. D.; GUSMÕES, P. P. G.; VALENTIM, R.; VISINTIN, J. A. Comparação dos índices reprodutivos com inseminação artificial ou cobertura natural sob influências sazonais em suínos. **Brazilian Journal of Veterinary**

**Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 486-490, 2000. Disponível em: <[https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5867/pdf\\_13](https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5867/pdf_13)>. Acesso em: 26 dez. 2019.

CERVENY, C.; KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Órgãos genitais masculinos**. In: KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. *Anatomia dos Animais Domésticos*. Porto Alegre: ARTMED. v.2, p.119-134, 2004.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. Disponível em: <<http://cbra.org.br/br/publicacoes/manual-de-exame-andrologico/>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. **Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 543 p.

DE ANDRADE, A. F. C.; DE ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0531.2006.00751.x>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

DORNELLES, J.; ROSSI, C. A. R.; SCHLÖSSER, L. M. de L.; RECH, R. D.; GRÄF, C. G.; DE ANDRADE, C. M.; SOARES, M.; CERON, M. S.; PATIAS, J. Intervalos de coletas de sêmen em reprodutores suínos no início da vida reprodutiva: avaliação dos parâmetros seminais. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre - RS, v. 1, n. 1, p. 02, 2019. Disponível em: <<https://www.seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/98315/55303>>. Acesso em: 01 jan. 2020.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M. G.; LOPES-CARDOSO, M. Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation. **Biology of Reproduction**, United Kingdom, v. 48, p. 483-489, 1993. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/48/3/483/2762134>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

JULIANO, F.; SERRET, C. G.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R.; NOGUEIRA, C. E. W.; VIDOR, T.; LUCIA JUNIOR, T.; DESCHAMPS, J. C.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N. Efeito do diluente Piggel na qualidade do sêmen suíno refrigerado em diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 899-906, out./dez. 2009. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744094017.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

KATZER, L. H.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Qualidade de sêmen suíno resfriado sob a influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. **ARS Veterinária**, Jaboticabal - SP, v. 20, n. 2, p. 233-241, 2004. Disponível em: <<http://www.arsveterinaria.org.br/arquivo/2004/v.20,%20n.2,%202004/233-241.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 787 p.

LABETA, C. P. de S.; MELLO, M. R. B. de; SILENCIATO, L. N.; ARRAIS, A. M.; VASCONCELOS, B. da S. de. Efeito da vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol) e de diferentes temperaturas na viabilidade de sêmen suíno refrigerado. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 152-159, 2017. Disponível em: <<http://rbmv.org/index.php/BJVM/article/view/930/758>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

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

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte - MG, v. 33, n. 4, p. 183-193, out./dez., 2009. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1010812/1/Marciane7.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2020.

MARTINS, F. M.; SANTOS FILHO, J. I. dos; TALAMINI, D. J. D. Conjuntura econômica da suinocultura brasileira. **Anuário 2019 da Suinocultura Industrial**, Itu - SP, ano 41, n. 06/2018, 13 dez. 2018. p. 22.

MARTINS, V. E. D. **Viabilidade do sêmen suíno resfriado a 15°C adicionado de antioxidantes**. 2015. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís - MA, 2015.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, out./dez., 2008. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB176%20Matos%20p225.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

MELLAGI, A. P. G.; QUIRINO, M.; OLIVEIRA, G. S.; GAGGINI, T. S.; PASCHOAL, A. F. L.; LUCCA, M. S.; ULGUIM, R. R.; BORTOLOZZO, F. P. Atualizações na avaliação andrológica em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 43, n. 2, p. 47-53, mai. 2019. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p047-53%20\(RB768\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p047-53%20(RB768).pdf)>. Acesso em: 14 fev. 2020.

MURGAS, L. D. S.; ZANGERÔNIMO, M. G.; SANTOS, A. G. O.; OLIVEIRA, S. L. de. Oxitocina no sêmen suíno heterospermico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 33-40, jul./dez. 2002. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Luis\\_SolisMurgas2/publication/43530057\\_OXITOCINA\\_NO\\_SEMEN\\_SUINO\\_HETEROSPERMICO\\_RESFRIADO\\_A\\_15\\_oC/links/02bfe50d076f069efe000000/OXITOCINA-NO-SEMEN-SUINO-HETEROSPERMICO-RESFRIADO-A-15-oC.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Luis_SolisMurgas2/publication/43530057_OXITOCINA_NO_SEMEN_SUINO_HETEROSPERMICO_RESFRIADO_A_15_oC/links/02bfe50d076f069efe000000/OXITOCINA-NO-SEMEN-SUINO-HETEROSPERMICO-RESFRIADO-A-15-oC.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2020.

NAMULA, Z.; HIRATA, M.; WITTAYARAT, M.; TANIHARA, F.; NGUYEN, N. T.; HIRANO, T.; NII, M.; OTOI, T. Effects of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid on the quality of frozen thawed boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 53, p. 1600-1604, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/rda.13288>>. Acesso em: 02 mar. 2020.

NGUYEN, T. V.; TANIHARA, F.; DOL, L. T. K.; SATO, Y.; TANIGUCHI, M.; TAKAGI, M.; VAN NGUYEN, T.; OTOI, T. Chlorogenic Acid Supplementation During *In Vitro* Maturation Improves Maturation, Fertilization and Developmental Competence of Porcine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 52, n. 6, p. 969-975, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/rda.13005>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

PAVANELI, A. P. P. **Influência do plasma seminal oriunda da fração rica do ejaculado sobre a capacitação e hiperativação espermática em sêmen suíno conservado sob refrigeração à 17°C por 72 horas**. 2018. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2018.

PEREIRA, B. A. **Adição de ácido clorogênico e cafeína ao sêmen suíno resfriado**. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2014.

PEREIRA, B. A.; CHAVES, B. R.; TELES, M. C.; PONTELO, T. P.; OLIVEIRA, C. R.; SOUZA, R. V. de; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ZANGERONIMO, M. G. Chlorogenic Acid Improves the Quality of Boar Semen Subjected to Cooled Storage at 15°C. **Andrologia**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/and.12978>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

REIS, G. dos R. **Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético**. 2002. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2002.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. de; PELÚZO, M. do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. da; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, Sept./Dec. 2005. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617/4350>>. Acesso em: 16 fev. 2020.

RIGO, V. H. B. **Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para inseminação artificial intrauterina**. 2016. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

RIGO, V. H. B.; MARTIN, S. M. M. K.; NICHI, M.; FREITAS, F. V. de; ANDRADE, A. F. C. de. O uso do resveratrol na conservação do sêmen suíno sob refrigeração. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte - MG, v. 40, n. 2, p. 615-619, abr./jun., 2017. Disponível em: <[http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n2/p615-619%20\(RB618\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n2/p615-619%20(RB618).pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2020.

RONDON, R. M. M.; ARAÚJO, A. A.; TONIOLLI, R.; RONDON, F. C. M. Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 3, p. 141-147, jul./set. 2012. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v36n3/p141-147%20\(RB277\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v36n3/p141-147%20(RB277).pdf)>. Acesso em: 18 fev. 2020.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, United States, v. 65, n. 5, p. 958-78, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0500395X>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

TELES, M. C.; PEREIRA, B. A.; ROCHA, L. G. P.; RESENDE, C. O.; RODRIGUES, V. V.; PEREIRA, L. J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ZANGERONIMO, M. G. Semen quality and reproductive performance of boars kept in pens containing conventional coffee husk as a floor covering. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v. 45, n. 7, p. 365-371, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v45n7/1516-3598-rbz-45-07-00365.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2020.

TOLEDO, L. T.; BENJAMIN, L. de A.; FARIA, B. D.; RODRIGUES, G. de A.; FERREIRA, C. R. de C.; LOPEZ, D. F. M. Revisão: utilização da imunocastração em suínos. **Revista Científica Univiçosa**, Viçosa - MG, v. 8, n. 1, p. 868-874, jan./dez., 2016. Disponível em: <<https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/750>>. Acesso em: 08 jan. 2020.

TONIOLLI, R.; COSTA, J. M. da S. Espécies reativas ao oxigênio, antioxidantes e suas implicações na qualidade do sêmen criopreservado de mamíferos domésticos. **Investigação**, Franca - SP, v. 16, n. 8, p. 22-29, 2017. Disponível em: <<http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/1396/956>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

TONIOLLI, R. Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. **Ciência Animal**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2012. Disponível em: <[http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA\\_PALESTRA%20\(28\).pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA_PALESTRA%20(28).pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2020.

TONIOLLI, R. Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. **Ciência Animal**, Ed. Especial, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 365-375, 2012. Disponível em: <[http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA\\_PALESTRA%20\(28\).pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA_PALESTRA%20(28).pdf)>. Acesso em: 29 dez. 2019.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 47-53, jan./mar. 2007. Disponível em: <<http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB105Valencapag47-53.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2020.

VALVERDE, A.; CASTRO-MORALES, O.; MADRIGAL-VALVERDE, M.; SOLER, C. Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: a review. **Revista de Biologia Tropical**, v. 67, n. 6, p. 1473-1487, december, 2019. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/35151-Article%20Text-137828-1-10-20191107.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2020.

VASCONCELOS, A. M. M. A.; MORAES, G. V. de; MOREIRA, I.; RIGOLON, L. P.; MARTINS, E. N. Características espermáticas de sêmen resfriado de suíno e conservado em diferentes diluentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v. 30, n. 2, p. 394-401, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbz/v30n2/5480.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

XAVIER, M. B. **Compostos bioativos, atividade antioxidante e antiproliferativa de duas cultivares do café arábica (coffea arábica)**. 2017. 100 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

ZANARDO, J. A. **Desempenho reprodutivo de varrões e matrizes suínas de diferentes linhagens durante as estações do ano**. 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2016.

## ANEXO A - PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS

---

### Método de preparo da câmara de avaliação espermática no Sistema CASA

---

**Objetivo:** determinar a concentração do ejaculado para posterior diluição, além de obter os valores de motilidade no sistema CASA de análise seminal.

**Procedimentos:**

- Diluição 1:9 - Em um microtubo tipo *ependorf*, pipetar 900  $\mu\text{L}$  de diluente e 100  $\mu\text{L}$  de sêmen *in natura*;
- Homogeneizar a solução;
- Pipetar 3  $\mu\text{L}$  da amostra e desprezar na câmara para contagem espermática;
- Observar a câmara em microscópio óptico com contraste de fase negativo, sob aumento de 20 vezes.

---

Fonte: elaborado pelos autores.

Referência: adaptado de Menegat et al. (2017).

---

---

**Método de classificação de ejaculados sensíveis ao acondicionamento térmico  
(extensores com duração de sete dias)**

---

**Objetivo:** Determinar no plantel de animais quais possuem ejaculados que não mantêm a viabilidade ao decorrer do tempo de acondicionamento térmico, com sêmen resfriado entre 15°C e 18 Graus Célsius.

**Procedimentos:**

- Coletas de sêmen uma vez por semana, por 5 semanas consecutivas, totalizando 5 ejaculados por animal;
- Cada ejaculado deve ser avaliado em três momentos diferentes: Hora 0 (H0 – dia da coleta), Hora 120 (H120 - 5 dias pós-coleta) e Hora 168 (H168 – 7 dias pós-coleta);
- Avaliar uma amostra em cada hora de avaliação no sistema de análise seminal CASA;
- Tabular os dados de Motilidade Progressiva (MP) em tabela eletrônica e classificar quanto à maior sensibilidade ao acondicionamento, média sensibilidade ou menor sensibilidade, da seguinte forma:
  - 1-  $MP < 60\%$  na H120 (ejaculado de maior sensibilidade);
  - 2-  $MP \geq 60\%$  na H120 e  $< 60\%$  na H168 (ejaculado de média sensibilidade);
  - 3-  $MP \geq 60\%$  na H168 (ejaculado de menor sensibilidade);
- Os animais que apresentarem, pelo menos, 3 dos 5 ejaculados no primeiro padrão de classificação são denominados animais com ejaculados sensíveis ao acondicionamento térmico.

---

Fonte: elaborado pelos autores.

Referência: adaptado de REIS, 2002.

---



---

**Método de diluição do Ácido Clorogênico (ChA - Chlorogenic acid crystalline, C3878 - Sigma-Aldrich®)**

---

**Objetivo:** fracionar o ChA, em microtubos tipo *ependorf*, de modo a se utilizar em cada dose inseminante (DI) de 45mL as respectivas concentrações, denominadas de tratamentos (T), em T1 - 0µg (controle); T2 - 1.500µg; T3 - 3.000µg; T4 - 4.500µg e T5 - 6.000µg.

**OBS.:** protocolo adaptado para experimento com coleta de ejaculados de 4 animais, uma vez por semana, durante 4 semanas consecutivas, totalizando 4 ejaculados por animal. Cada semana contém 4 repetições de cada tratamento, logo 4 T1, 4 T2, 4 T3, 4 T4 e 4 T5.

**Procedimentos:**

- O ChA, sendo um composto fenólico, possui característica hidrofílica, ou seja, de fácil dissolução em água;
- Para diminuir o erro na pesagem do ácido, executada em balança de precisão, pesar todos os tratamentos com mesma concentração (ex.: 4 T2) em 1 *ependorf* para cada semana de repetição.
- A concentração final de ChA em cada microtubo, de cada tratamento, dispõe-se da seguinte forma:
  - T2 - 1.500µg, logo 4 tratamentos x 1.500µg cada um = 6.000µg totais para a 1ª semana;
  - T3 - 3.000µg, logo 4 tratamentos x 3.000µg cada um = 12.000µg totais para a 1ª semana;
  - T4 - 4.500µg, logo 4 tratamentos x 4.500µg cada um = 18.000µg totais para a 1ª semana;
  - T5 - 6.000µg, logo 4 tratamentos x 6.000µg cada um = 24.000µg totais para a 1ª semana;
- Pipetar 400µL de diluente e desprezar em cada *ependorf* que contém as concentrações finais do ácido, homogeneizar e distribuir novamente a solução final em cada DI de 45 mL.
- Cada DI receberá ¼ da concentração final do ácido, ou seja, a quantidade pertinente a cada tratamento, em microgramas (ex.: *ependorf* do T2, com concentração final de 6.000µg, resultará na dosagem final de 1.500µg de ChA na DI de 45mL).

---

Fonte: elaborado pelos autores.

Referência: adaptado de PEREIRA et al., 2017.

---

---

**Método para avaliação de integridade de membrana espermática plasmática e  
acrossomal por Citometria de Fluxo**

---

**Objetivo:** avaliar o grau de lesão celular decorrente da peroxidação lipídica sofrida pelas estruturas celulares.

**Procedimentos:**

- Adicionar na amostra 2,0µL de Iodeto de Propídio (IP-0,25 mg mL<sup>-1</sup>, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 1,0 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg mL<sup>-1</sup>, L-0770, Sigma Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA).
- Estas duas sondas têm o objetivo de corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) e com a membrana acrossomal reagida (FITC-PSA positivo).
- As amostras devem apresentaram 20.000 células analisadas em citômetro de fluxo.

---

Fonte: elaborado pelos autores.

Referência: adaptado de De Andrade et al. (2007) e De Andrade et al. (2011).

---

---

### Método para avaliação do Teste de Termo Resistência (TTR)

---

**Objetivo:** avaliar a resistência dos espermatozoides, ao passar do tempo, em temperatura controlada de 37°C, simulando o tempo transcorrido durante a cinética espermática no trato reprodutor da fêmea.

**Procedimentos:**

- Incuba-se alíquotas de 10 mL em banho-maria, de cada amostra, em temperatura de 37°C;
- 1ª avaliação: após 30 min de acondicionamento em banho-maria;
- 2ª avaliação: 120 min após o acondicionamento em banho-maria;
- Avaliações quanto aos parâmetros de motilidade espermática, no sistema CASA.

---

Fonte: elaborado pelos autores.

Referência: CBRA, 2013.

---

---

### Método para avaliação de morfologia espermática

---

**Objetivo:** quantificar, em porcentagem, o número de células com alterações morfológicas que possivelmente venham a comprometer a fecundação dos ovócitos.

**Procedimentos:**

- Em uma lâmina desprezar 3,5 µL do sêmen pré-diluído;
- Adicionar mais 3,5 µL de corante eosina/nigrosina;
- Realizar o esfregaço com outra lâmina, esperar secar e avaliar em microscópio óptico, sob aumento de 1000 vezes, com imersão em óleo;
- Devem ser contadas 200 células, classificadas morfolologicamente em defeitos primários, secundários, terciários e células íntegras.

---

Fonte: elaborado pelos autores.

Referência: adaptado de CBRA, 2013.

---