

## **Análises avançadas do sêmen suíno: como a evolução do CASA e citometria de fluxo e aplicação de biomarcadores podem aprimorar a produção de doses de sêmen**

*Advanced analysis of boar semen: impact of the evolution of CASA, flow cytometry, and biomarkers on the quality and production of semen doses*

**Ivan Cunha Bustamante Filho**

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
Universidade do Vale do Taquari – Univates, Lajeado, RS, Brasil  
E-mail: ivanbustamante.filho@gmail.com

### **Resumo**

O presente artigo discute métodos avançados de análise seminal em suínos para superar limitações das avaliações tradicionais. São abordados: a evolução dos sistemas CASA (análise computadorizada de sêmen), garantindo objetividade e alto rendimento na cinética espermática; a citometria de fluxo para avaliações multiparamétricas — incluindo viabilidade, potencial mitocondrial, estresse oxidativo e detecção rápida de contaminação bacteriana por sondas fluorescentes; e a aplicação de biomarcadores proteômicos e metabolômicos na seleção de ejaculados e reprodutores. Essas ferramentas complementares otimizam a inseminação artificial em doses reduzidas, promovendo sustentabilidade na suinocultura. Contudo, persistem desafios como falta de padronização, altos custos e necessidade de pessoal especializado. O futuro promissor reside na integração com inteligência artificial e aprendizado de máquina, permitindo extrair padrões preditivos ocultos, classificar subpopulações espermáticas com potencial fertilizante e maximizar o aproveitamento genético com menor impacto ambiental.

**Palavras-chave:** suínos, análise computadorizada de sêmen (CASA), citometria de fluxo, biomarcadores, inseminação artificial

### **Abstract**

*This article discusses advanced methods for boar semen analysis aimed at overcoming the limitations of traditional evaluations. It addresses the evolution of computer-assisted sperm analysis (CASA) systems, ensuring objectivity and high throughput in sperm kinetic assessment; flow cytometry for multiparametric evaluations — including viability, mitochondrial potential, oxidative stress, and rapid detection of bacterial contamination using fluorescent probes; and the application of proteomic and metabolomic biomarkers for the selection of ejaculates and boars. These complementary tools optimize artificial insemination with reduced doses, promoting sustainability in pig production. However, challenges persist, including lack of standardization, high operational costs, and the need for specialized personnel. The promising future lies in integration with artificial intelligence and machine learning, enabling the extraction of hidden predictive patterns, classification of sperm subpopulations with fertilizing potential, and maximization of genetic utilization with lower environmental impact.*

**Keywords:** swine, computer-assisted semen analysis (CASA), flow cytometry, biomarkers, artificial insemination

### **Introdução**

A suinocultura brasileira apresenta um elevado nível de tecnificação, com 94,4% do plantel de matrizes em rotina de inseminação artificial (IA) em 2019 (Viana et al., 2020), índice que supera ligeiramente a média de 93% de países líderes em produção (Schulze et al., 2019). Destaca-se ainda que o Brasil adotou rapidamente a inseminação artificial pós-cervical (IAIU), que já representa 79,7% dos procedimentos realizados, consolidando o país como um dos maiores usuários mundiais dessa biotecnologia (Viana et al., 2020). Nesse contexto, a avaliação da qualidade seminal é de fundamental importância para o sucesso dos programas reprodutivos baseados na IA (Colenbrander et al., 1993).

Vários fatores podem afetar a qualidade do sêmen, como a estação do ano (Lopez-Rodriguez et al., 2017), diferenças individuais (Broekhuijse et al., 2012), idade (Savic et al., 2013) ou linhagem do cachaço (Valverde et al., 2018), comprometendo a fertilidade das matrizes inseminadas (Broekhuijse et al., 2015). As estimativas de qualidade seminal podem ser influenciadas pelos métodos empregados na avaliação, de modo que avaliações precisas são essenciais, com esforços contínuos para desenvolver métodos objetivos. Os parâmetros comumente avaliados, como concentração espermática (Maes et al., 2010; Camus et al., 2011; Brito et al., 2016), motilidade (Yeste et al., 2018), viabilidade (Pintado et al., 2000) e anormalidades morfológicas (Soler et al., 2016), podem variar conforme a metodologia adotada. Porém, o investimento em tecnologias de análise, processamento e preservação seminal promoveram uma elevada tecnificação das Unidades de Difusão Genética (UDG) de forma geral no país. Estas tecnologias, beneficiadas por avaliações computadorizadas, reduzem a subjetividade, além de se integrarem a softwares de gestão de produção, comercialização e distribuição de doses, visando assegurar que elas saiam do laboratório nas melhores condições possíveis.

Contudo, diversos desafios se impõem e estimulam a busca por otimizações, melhorias e redução de custos na produção de doses de sêmen suíno. Esses desafios abrangem a baixa correlação das técnicas tradicionais (motilidade, viabilidade) com a fertilidade in vivo (<0,4), variabilidade biológica (estação, idade, linhagem) e contaminação bacteriana, agravados pela adoção de doses reduzidas e criopreservação. Além disso, pressões ambientais impulsionam a redução do plantel de reprodutores para minimizar emissões de metano e uso de recursos, sem reduzir os níveis de produção.

Diante desses avanços e limitações, o presente artigo discute métodos avançados de análise seminal em suínos, visando mitigar os gargalos das avaliações tradicionais. São abordados a evolução dos sistemas de análise computadorizada de sêmen (CASA), as oportunidades de implementação da citometria de fluxo para avaliações multiparamétricas — incluindo detecção rápida de contaminação microbiana via sondas fluorescentes —, e a aplicação de biomarcadores proteômicos e metabolômicos na seleção de ejaculados e reprodutores, otimizando a inseminação artificial em doses reduzidas e promovendo sustentabilidade na suinocultura.

### Computer-Assisted Sperm Analysis

O sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) evoluiu significativamente ao longo de aproximadamente 40 anos, impulsionado por avanços em dispositivos de captura de imagem, aumento do poder computacional e novos algoritmos de software. Inicialmente concebidos como ferramentas para pesquisas básicas visando à eliminação do viés subjetivo de técnicos, os sistemas pioneiros baseavam-se na identificação de bordas e rastreamento de trajetórias primordiais. Com o tempo, a tecnologia passou de sistemas fechados, muitas vezes descritos como "caixas pretas", para plataformas mais abertas e ajustáveis, permitindo a integração com microscópios convencionais e o desenvolvimento de plugins de código aberto, como o ImageJ CASA, que facilitaram o acesso e a transparência dos dados (Boe-Hansen e Satake, 2019; Aragón-Martínez, 2026). Apesar da modernização, os conceitos básicos para identificar o espermatozoide e seus padrões de movimento permanecem pouco alterados desde o início da tecnologia.

A avaliação cinemática pelo sistema CASA baseia-se na construção de trajetórias a partir dos centroides das cabeças espermáticas identificadas em sucessivos quadros. Os principais parâmetros incluem a velocidade curvilínea (VCL), que mede a distância total percorrida; a velocidade de trajetória média (VAP); e a velocidade de linha reta (VSL). A partir dessas velocidades, derivam-se índices de robustez do movimento, como a linearidade (LIN), a retilineidade (STR) e a oscilação (WOB). Outros descritores fundamentais são a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) e a frequência de batimento cruzado (BCF). Para suínos, parâmetros padrão frequentemente utilizam o limiar de VAP > 20  $\mu\text{m/s}$  para definir a motilidade total. Conforme as fontes, essas medidas condensadas são representações numéricas de coordenadas brutas (x, y) capturadas em um espaço bidimensional.

Diante da robustez dessas medidas, a aplicação do CASA em centrais de processamento de sêmen suíno oferece vantagens em relação à análise subjetiva, principalmente pela redução do viés do técnico e pela garantia de repetibilidade. Em unidades de produção, o sistema facilita um alto rendimento por hora de doses comercializáveis, permitindo o descarte rápido de ejaculados inadequados por meio de medições simultâneas de concentração e motilidade. Além disso, a capacidade de alguns sistemas de detectar automaticamente anormalidades morfológicas, como gotas citoplasmáticas e caudas dobradas, agrega um valor informativo essencial para o controle de qualidade. Conforme afirmam Amann e Waberski (2014), o sistema oferece uma base confiável para rejeitar ou aceitar amostras de sêmen, assegurando que o produto final atenda às especificações de mercado.

Embora as vantagens operacionais sejam evidentes, desafios persistentes limitam a tecnologia: a maioria dos sistemas CASA ainda opera em um plano bidimensional, o que restringe a análise dos padrões

naturais de movimento helicoidal dos espermatozoides suínos em 3D. Nesse contexto de superação das limitações tradicionais, as abordagens recentes no uso do sistema CASA transcendem a análise de médias populacionais, focando na heterogeneidade intrínseca das amostras através da análise de subpopulações espermáticas (Ramón e Martínez-Pastor, 2018; Hackerova et al., 2025). A implementação de métodos estatísticos multivariados, como o agrupamento não supervisionado (*clustering*), permite identificar padrões cinéticos complexos que auxiliam na predição da fertilidade e da capacidade de criopreservação (Ramón e Martínez-Pastor, 2018). Inovações como o uso de *Machine Learning*, especificamente *Support Vector Machine* (SVM), possibilitam a classificação automatizada de padrões de motilidade, como a transição para a hiperativação, com precisão superior aos métodos tradicionais (Ramón e Martínez-Pastor, 2018). Adicionalmente, o desenvolvimento de modelos matemáticos como a dimensão fractal (FDM) para identificar espermatozoides hiperativados, o uso de citometria de fluxo por imagem e o rastreamento em três dimensões (3D) representam avanços importantes para simular o comportamento espermático em condições que se aproximam do ambiente in vivo (Hackerova et al., 2025; Ramón e Martínez-Pastor, 2018).

Apesar do progresso tecnológico, o sistema CASA enfrenta desafios significativos relacionados à falta de padronização de protocolos, o que compromete a comparabilidade de dados entre laboratórios e centrais (Hackerova et al., 2025; Ramón e Martínez-Pastor, 2018). As variações nos resultados são frequentemente atribuídas a diferenças de hardware, software e algoritmos proprietários ("caixas pretas"), além da sensibilidade do sistema a fatores técnicos como a taxa de quadros (frame rate) e o tipo de câmara de contagem utilizada (Hackerova et al., 2025). A profundidade da câmara e o método de preenchimento podem induzir o efeito Segre–Silberberg, resultando em distribuição desigual das células, enquanto a presença de debris em diluentes pode gerar erros na detecção de cabeças espermáticas (Hackerova et al., 2025). Além disso, o alto custo de lâminas calibradas, a exigência de operadores treinados para minimizar a variabilidade e a limitação da maioria dos sistemas à análise bidimensional de um movimento naturalmente helicoidal permanecem como obstáculos críticos para a tecnologia (Hackerova et al., 2025; Ramón e Martínez-Pastor, 2018).

### Citometria de fluxo

Inicialmente aplicada a hematologia, a citometria de fluxo (CF) consolidou-se o "padrão-ouro" na análise de células em matrizes fluidas, como por exemplo a imunofenotipagem de células sanguíneas na classificação e estadiamento de leucemias. A trajetória desta tecnologia na andrologia iniciou-se no final da década de 1970, com os desenvolvimentos pioneiros de Wolfgang Göhde e da empresa Partec (Boe-Hansen e Satake, 2019). Na avaliação seminal, marcos importantes incluem o trabalho de Dr. Duane Garner na validação de fluorocromos como o SYBR-14 associado ao iodeto de propídio (PI) para avaliação de viabilidade, além do desenvolvimento de protocolos para a sexagem de espermatozoides (citado por Boe-Hansen e Satake, 2019).

A análise seminal por citometria de fluxo permite a avaliação simultânea de diversos parâmetros funcionais e estruturais de forma individual de cada espermatozoide de uma amostra. Em poucos segundos, são avaliados entre 10.000 e 30.000 células, garantindo praticidade a rotina e diminuindo vieses subjetivos (Boe-Hansen e Satake, 2019; Maside et al., 2023). Entre os principais parâmetros destacam-se a viabilidade espermática, frequentemente mensurada pela integridade da membrana plasmática (ex.: SYBR-14/PI, Yo-Pro-1), e a integridade acrossomal, avaliada por lectinas vegetais como PNA ou PSA conjugadas a fluorocromos (Boe-Hansen e Satake, 2019; Maside et al., 2023; Quirino et al., 2022). Para além do dano estrutural, é possível avaliar características funcionais como o potencial de membrana mitocondrial (utilizando JC-1 ou Rodamina 123), níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e lipoperoxidação para monitorar o estresse oxidativo espermático, e a fragmentação de DNA através de ensaios como o SCSA ou TUNEL (Boe-Hansen e Satake, 2019; Maside et al., 2023; Yang et al., 2025).

Com o desenvolvimento de equipamentos mais robustos, com maior espectro de lasers e maior número de detectores, é possível realizar múltiplas sondas por análise, aplicando as informações obtidas por células, como demonstrado por Torres et al (2016), Jäkel et al. (2020) e Lacalle et al. (2025). Mais recentemente, foram propostas novas abordagens para monitorar a função celular via ativação de segundos mensageiros (PKA, PKC) e a reorganização de fosfolípidios durante a capacitação, o que auxilia na predição de fertilidade e criotolerância espermática (Maside et al., 2023; Purdy et al., 2022).

A integração da citometria de fluxo com a avaliação genômica pode representar um avanço significativo na compreensão da base genética de características seminais complexas em suínos, permitindo ir além dos parâmetros convencionais de motilidade e concentração. Ao associar os resultados de estudos de associação genômica ampla (GWAS), foi possível identificar regiões de loci de características quantitativas (QTL) e genes candidatos específicos, como o *SIRT5* para níveis de ROS e os genes *TMEM65*

e *SLC8B1* para MMP, que estão envolvidos na regulação do estresse oxidativo e no transporte de cálcio mitocondrial (Yang et al., 2025). A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados a essas funções celulares fundamentais oferece subsídios para aprimorar modelos de predição genômica e estratégias de seleção assistida por marcadores na suinocultura (Yang et al., 2025).

Outra aplicação da FC na avaliação espermática, é a mensuração da contaminação bacteriana no sêmen suíno. Este é um desafio constante na produção de doses, originando-se tanto da microbiota do animal quanto do ambiente de coleta (Contreras et al., 2022; Ngo et al., 2025). Embora prejudique a motilidade e a viabilidade espermática, o controle imediato desse problema é limitado pela lentidão dos métodos tradicionais de cultura que exigem até 48 horas para resultados (Oehler et al., 2019; Ngo et al., 2025). Como alternativa para o monitoramento em tempo real, desenvolveu-se um protocolo de citometria de fluxo baseado na marcação de "vivo/morto" utilizando os fluorocromos SYBR Green I, que penetra em todas as células, e Iodeto de Propídio (PI), que marca apenas células com membranas danificadas (Oehler et al., 2019). Através de gráficos de pontos bivariados de intensidade de fluorescência verde vs. vermelha e excitação por laser de 488 nm, o sistema permite discriminar populações de bactérias viáveis de detritos e espermatozoides, estes últimos facilmente identificados por sua maior intensidade de fluorescência devido ao tamanho (Oehler et al., 2019). Essa abordagem oferece uma ferramenta objetiva e de alto rendimento para o uso *on-line* em centrais de inseminação, permitindo o descarte imediato de ejaculados altamente contaminados (Oehler et al., 2019; Contreras et al., 2022).

Outra contribuição importante da citometria de fluxo (CF) na andrologia foi o desenvolvimento de protocolos de sexagem espermática. Os primeiros resultados foram descritos na década de 1980 e, desde então, diversos avanços – como a melhoria dos protocolos, o uso de sondas fluorescentes e o aperfeiçoamento dos equipamentos de CF acoplados a sistemas de separação celular (*cell sorters*) – têm garantido resultados aceitáveis na separação de espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y, com pureza superior a 90% (Vasquez et al., 2009; Espinosa-Cervantes e Córdova-Izquierdo, 2013). O princípio utilizado na sexagem espermática permanece o mesmo: emprega-se uma sonda fluorescente (por exemplo, Hoechst 33342) que se liga ao DNA espermático, permitindo a identificação de células com maior ou menor intensidade de marcação. Essa diferença de marcação ocorre devido à conhecida variação na quantidade de DNA entre células que carregam o cromossomo X e aquelas que carregam o Y – diferença essa de aproximadamente 3,8% em suínos (Vasquez et al., 2009).

Em bovinos, a tecnologia está bem desenvolvida e comercialmente estabelecida no Brasil e no mundo. No entanto, apesar desses avanços técnicos, limitações importantes ainda impedem uma implementação mais ampla dessa tecnologia na reprodução suína. Destacam-se os danos celulares causados pela marcação com sondas e o estresse físico durante a separação, variações observadas entre diferentes reprodutores e entre ejaculados de um mesmo reprodutor (Alkimin et al., 2014), além das altas taxas de diluição durante o procedimento (Del Olmo et al., 2013). Chama-se atenção ainda para dois desafios importantes: primeiro, o longo tempo necessário para realizar a sexagem, uma vez que a taxa média de sexagem é de  $20 \times 10^6$  células por hora, o que traz desafios para uma produção efetiva de doses tradicionais em escala comercial ( $3 \times 10^9$  sptz/dose). O uso de IA profunda permite o uso de doses com menor quantidade total de espermatozoides, e o aperfeiçoamento destas biotécnicas poderão beneficiar a aplicação de sêmen sexado na espécie (Knox, 2016). Outro desafio importante é a falta de métodos eficazes para preservar o sêmen pós-sexado. Diluentes suplementados com gema de ovo, espermadesinas e antioxidante se mostraram promissores, mas não definitivos (García et al., 2007). Outro aspecto importante, além da resistência a preservação, é uma diminuição da capacidade de se ligar ao epitélio do oviduto em espermatozoides sexados. Como resultado, a migração e formação de reservatório espermático no oviduto são ineficientes, comprometendo as taxas de fertilidade (Winters et al., 2018).

Como ocorreu com o CASA há 20 anos, a citometria de fluxo enfrenta limitações práticas significativas para sua implementação na rotina da suinocultura, como o alto custo de aquisição e manutenção de equipamentos e reagentes (Boe-Hansen e Satake, 2019; Maside et al., 2023). A operação exige pessoal altamente especializado para a execução de protocolos e, especialmente, para a complexa interpretação de dados, incluindo a compensação de sobreposição espectral em ensaios multicoloridos (Boe-Hansen e Satake, 2019; Quirino et al., 2022). Outro desafio crítico é a falta de padronização de protocolos entre laboratórios, o que dificulta a comparação de resultados e a validação de parâmetros robustos para a predição de fertilidade em campo (Boe-Hansen e Satake, 2019; Maside et al., 2023). Atualmente, a aplicação em larga escala em unidades de produção comercial permanece diminuta, sendo a tecnologia mais utilizada em centros de pesquisa ou em estações de inseminação artificial de referência na Europa e Estados Unidos (Boe-Hansen e Satake, 2019; Oehler et al., 2019).

### **Biomarcadores proteicos e metabólicos do sêmen suíno**

A aplicação das ciências ômicas representou um avanço fundamental para aprofundar o conhecimento sobre a complexa fisiologia do sêmen suíno, superando as limitações de sensibilidade e acurácia dos métodos convencionais de análise (Llavanera, 2024). A proteômica permite o estudo em larga escala das proteínas, suas interações e modificações pós-traducionais (PTMs), que são consideradas eventos moleculares essenciais para a funcionalidade espermática e o sucesso da fertilização (Parrilla et al., 2019; Llavanera, 2024). Paralelamente, a metabolômica analisa moléculas de baixa massa molecular (1500 Da) que, por serem os produtos finais das vias de sinalização celular, fornecem um retrato fiel do estado fisiológico e do fenótipo real dos espermatozoides e do plasma seminal em um dado momento (Torres et al., 2022; Mateo-Otero et al., 2021). De forma integrada, essas tecnologias viabilizam a identificação de biomarcadores específicos associados à fertilidade *in vivo*, à maturidade sexual e à resiliência celular durante processos de estresse, como a preservação líquida ou a criopreservação (Mateo-Otero et al., 2021; Shrestha et al., 2025; Torres et al., 2022). Esse conhecimento aprofundado possibilita a seleção precoce de reprodutores e o desenvolvimento de novas estratégias para otimizar a eficiência reprodutiva na indústria suinícola (Llavanera et al., 2024; Parrilla et al., 2019). A seguir, ambas as abordagens serão discutidas.

A proteômica é definida como o estudo em larga escala das proteínas, abrangendo sua identificação, quantificação e análise de modificações pós-traducionais (PTMs) em sistemas biológicos (Parrilla et al., 2019; Bustamante-Filho et al., 2022). Atualmente, a técnica mais empregada em proteômica é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS), por meio de abordagens como a proteômica *shotgun* (label-free) ou marcações isobáricas (iTRAQ/TMT), permitindo a detecção de milhares de proteínas com alta sensibilidade (Parrilla et al., 2019; Bustamante-Filho et al., 2022; Song et al., 2024). Na suinocultura, os delineamentos experimentais proteômicos comumente envolvem a comparação entre machos com fertilidade contrastante (Lucca et al., 2024), a avaliação de estresses sazonais sobre a qualidade seminal (Argenti et al., 2018) e caracterização do perfil proteico espermático e de plasma seminal de animais com diferentes classificações da maturação espermática desde o fluido epididimário até o sêmen ejaculado (Weber et al., 2020; Pérez-Patiño et al., 2019).

Diversas proteínas e vias metabólicas foram identificadas como determinantes para a funcionalidade espermática. Proteínas envolvidas na interação espermatozoide-oócito e ligação à zona pelúcida, como a ZBPB1, a ZBPB2 e a hialuronidase SPAM1, apresentam correlação direta com o sucesso da fertilização e taxas de parição (Parrilla et al., 2019; Lucca et al., 2024; Weber et al., 2020). A motilidade progressiva está intimamente ligada a enzimas do metabolismo energético, incluindo a enolase (ENO3), a triosefosfato isomerase e a lactato desidrogenase, essenciais para a produção de ATP via glicólise e ciclo do TCA (Weber et al., 2020; Pérez-Patiño et al., 2019). O sistema de defesa antioxidante, mediado por enzimas como a glutationa peroxidase 5 (GPX5) e a superóxido dismutase 1 (SOD1), é crucial para proteger a integridade das membranas contra o dano oxidativo (Song et al., 2024; Argenti et al., 2018; Weber et al., 2020). Adicionalmente, proteínas reguladoras da capacitação, como a ACRBP e as espermedesinas (PSP-I/PSP-II), desempenham papéis na estabilização da membrana durante o trânsito no trato reprodutivo (Parrilla et al., 2019; Pérez-Patiño et al., 2019; Weber et al., 2020).

A identificação de biomarcadores proteômicos permitiu avanços na seleção de machos com maior resistência à preservação seminal. Para o armazenamento líquido a 17°C, proteínas como a catepsina B, a espermedesina PSP-I e a proteína secretória epididimária E1 (NPC2) correlacionam-se com uma maior resiliência da motilidade (Bustamante-Filho et al., 2022; De Lazari et al., 2020). Em contrapartida, altos níveis de metabólitos como leucina e isoleucina no plasma seminal são indicadores de baixa capacidade de preservação (Mateo-Otero et al., 2021; Song et al., 2024). Na resistência à criopreservação, proteínas de estresse (HSPA1L/HSP70 e HSP90AA1) e proteínas de adesão, como a fibronectina (FN1), são fundamentais para proteger a célula contra o choque frio e manter a estabilidade estrutural (Parrilla et al., 2019; Pérez-Patiño et al., 2019). Por fim, em condições de refrigeração hipotérmica a 5°C, reguladores da proteólise e da imunidade, como a clusterina e a leguminaína, foram associados exclusivamente a machos com alta resistência à preservação (Menezes et al., 2020).

A metabolômica é definida como o estudo abrangente de moléculas de baixa massa molecular (1500 Da), conhecidas como metabólitos, que representam os produtos finais de processos celulares e fornecem um retrato fiel do estado fisiológico de um sistema biológico em um determinado momento (Llavanera, 2024; Torres et al., 2022). As principais plataformas analíticas utilizadas para a identificação e quantificação dessas moléculas no sêmen suíno são a espectrometria de massas (MS), frequentemente acoplada à cromatografia líquida (LC-MS), e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Mateo-Otero et al., 2021; Shrestha et al., 2025; Sui et al., 2022). Os delineamentos experimentais comuns nesta área incluem a comparação de perfis metabólicos entre machos ou ejaculados de alta e baixa fertilidade ou taxas de concepção (Llavanera, 2024), a caracterização de fenótipos de boa e baixa

congelabilidade (Sui et al., 2023; Torres et al., 2022), a análise de perfis temporais relacionados à maturidade sexual (Shrestha et al., 2025) e a avaliação de alterações metabólicas induzidas por condições de estresse, como o estresse térmico (Sui et al., 2022).

Marcadores metabólicos específicos no plasma seminal e nos espermatozoides têm sido associados diretamente à fertilidade in vivo de cachorros. Metabólitos relacionados ao metabolismo energético, como o sn-glicero-3-fosfolina, carnitina, hipotaurina, glutamato e glicose, demonstraram potencial para discriminar o tamanho da letegada (Llavanera, 2024). A suplementação dietética com ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) elevou os níveis de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), como malato e isocitrato, no plasma seminal, o que resultou em melhor função mitocondrial espermática e maiores taxas de parição (Wang et al., 2025). No âmbito do estresse oxidativo, a concentração de metanol no plasma seminal correlacionou-se positivamente com a geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) intracelular, enquanto a tirosina e a carnitina também influenciaram positivamente a produção de espécies reativas de oxigênio (Mateo-Otero et al., 2021). Além disso, metabólitos como 4-aminobenzoato, D-biotina e L-serina foram identificados como marcadores de altas taxas de concepção após inseminação artificial (Llavanera, 2024).

Em relação à preservação espermática, a metabolômica identificou assinaturas que definem a resiliência celular. Para a criopreservação, marcadores como inosina, hipoxantina, creatina, ADP e niacinamida estão envolvidos na aquisição de criotolerância durante o tempo de repouso (*holding time*) a 17°C, sendo essenciais para a produção de energia pós-descongelamento (Torres et al., 2022). O ácido oleico e a oleamida também foram destacados como marcadores positivos de congelabilidade, enquanto a L-citrulina e o triptofano surgem como potenciais indicadores em raças nativas (Sui et al., 2023; Zhang et al., 2023). Para a refrigeração a 17°C, concentrações de leucina, isoleucina, carnitina e hipotaurina no plasma seminal associam-se à capacidade do espermatozoide em manter a motilidade progressiva durante o armazenamento líquido por até 72 horas (Mateo-Otero et al., 2021). Adicionalmente, o mio-inositol e o ácido homoisovanílico foram identificados como metabólitos chave que aumentam com a maturação sexual, correlacionando-se com uma melhor integridade de membrana e qualidade seminal para uso em programas de reprodução (Shrestha et al., 2025).

### Considerações finais

A avaliação seminal em suínos avançou significativamente nas últimas décadas, indo além dos métodos convencionais. O sistema CASA consolidou-se como item quase obrigatório nas UDG, garantindo objetividade, repetibilidade e alto rendimento na análise cinética. A citometria de fluxo, apesar dos avanços em protocolos que permitem avaliações multiparamétricas simultâneas, ainda não se mostrou viável para implementação na rotina comercial, apesar de largamente utilizada em pesquisa. Os biomarcadores proteômicos e metabolômicos, por sua vez, oferecem uma janela preditiva para a fertilidade in vivo e a resiliência espermática à preservação, preenchendo a lacuna deixada pela baixa correlação dos parâmetros clássicos com o desempenho reprodutivo a campo. Sua aplicação também se restringe à pesquisa e desenvolvimento, sendo determinante para a avaliação mais precisa do impacto celular de novos métodos de preservação e processamento espermático

Apesar dessas vantagens, persistem desafios como a falta de padronização entre laboratórios, os altos custos operacionais e a necessidade de pessoal especializado, que restringem a aplicação em larga escala dessas tecnologias. Contudo, o futuro é promissor: a integração dessas ferramentas com a análise avançada de dados, especialmente por meio da inteligência artificial e do aprendizado de máquina, permitirá extrair padrões preditivos ocultos, classificar subpopulações espermáticas com potencial fertilizante e otimizar a seleção de reprodutores (Aragón-Martínez, 2026). Essa convergência tecnológica não apenas reduzirá custos e melhorará a eficiência da inseminação artificial suína, mas também impulsionará a sustentabilidade do setor ao maximizar o aproveitamento genético com menor impacto ambiental.

### Referências

- Alkmin, DV, Parrilla, I, Tarantini, T, Parlapan, L, Del Olmo, D, Vazquez, JM, Martinez, EA, Roca, J.** Intra- and interboar variability in flow cytometric sperm sex sorting. *Theriogenology*, v.82, n.3, p.501-508, 2014.
- Amann, RP, Waberski, D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.81, n.1, p.5-17, 2014.
- Aragón-Martínez, A.** Unraveling sperm kinematic heterogeneity with machine learning. *Asian Journal of Andrology*, v.28, n.2, p.143-150, 2026.

- Argenti, LE, Parmeggiani, BS, Leipnitz, G, Weber, A, Pereira, GR, Bustamante-Filho, IC.** Effects of season on boar semen parameters and antioxidant enzymes in the south subtropical region in Brazil. *Andrologia*, v.50, n.5, e 12951, 2018.
- Boe-Hansen, GB, Satake, N.** An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, v.137, p.93-103, 2019.
- Brito, LFC, Alves, BG, Rodrigues, APR, Silva, AR.** Andrology laboratory review: evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, v.85, p.1507-1527, 2016.
- Broeckhuijse, MLWJ, Šoštarić, E, Feitsma, H, Gadela, B.** Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science*, v.90, p.779-789, 2012.
- Broeckhuijse, M, Feitsma, H, Gadela, B.** Efficient boar semen production and genetic contribution: the impact of low-dose artificial insemination on fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, suppl.2, p.103-109, 2015.
- Bustamante-Filho, IC, Pasini, M, Moura, AA.** Spermatozoa and seminal plasma proteomics: Too many molecules, too few markers. The case of bovine and porcine semen. *Animal Reproduction Science*, v.247, 107075, 2022.
- Camus, A, Camugli, S, Lejeune, JP, Maillard, R.** Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration? *Theriogenology*, v.75, p.577-583, 2011.
- Espinosa-Cervantes, R, Córdova-Izquierdo, A.** Sexing sperm of domestic animals. *Tropical Animal Health and Production*, v.45, n.1, p.1-8, 2013.
- Colenbrander, B, Feitsma, H, Grooten, HJ.** Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.48, p.207-215, 1993.
- Contreras, MJ, Núñez-Montero, K, Bruna, P, García, M, Leal, K, Barrientos, L, Weber, H.** Bacteria and Boar Semen Storage: Progress and Challenges. *Antibiotics*, v.11, n.12, 1796, 2022.
- De Lazari, FL, Sontag, ER, Schneider, A, et al.** Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 °C. *Theriogenology*, v.147, p.135-145, 2020.
- Del Olmo, D, Parrilla, I, Gil, MA, Maside, C, et al.** Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v.80, n.4, p.350-356, 2013.
- García, EM, Vazquez, JM, Parrilla, I, et al.** Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.68, p.771-778, 2007.
- Hackerova, L, Simonik, O, Kucera, T, Prochazka, E.** Boar sperm motility assessment using computer-assisted sperm analysis: current practices, limitations, and methodological challenges. *Animals*, v.15, n.3, 305, 2025.
- Jäkel, H, Henning, H, Luther, AM, Rohn, K, Waberski, D.** Assessment of chilling injury in hypothermic stored boar spermatozoa by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A*, v.99, n.10, p.1033-1041, 2021.
- Knox, RV.** Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, v.85, p.83-93, 2016.
- Lacalle, E, Fernández-Alegre, E, Gómez-Giménez, B, et al.** Application of flow cytometry using advanced chromatin analyses for assessing changes in sperm structure and DNA integrity in a porcine model. *International Journal of Molecular Sciences*, v.25, n.4, 1953, 2024.
- Llavanera, M.** Evaluation of sperm quality and male fertility: The use of molecular markers in boar sperm and seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, v.269, p.1-15, 2024.
- Lopez-Rodriguez, A, Van Soom, A, Arteaga, AA, MAES, D.** Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management*, v.3, p.15, 2017.
- Lucca, MS, Bustamante-Filho, IC, Ulguim, RR, et al.** Proteomic analysis of boar seminal plasma: Putative markers for fertility based on capacity of semen preservation at 17°C. *Molecular Reproduction and Development*, v.91, n.1, e23735, 2024.
- Maes, D, Rijsselaere, T, VYT, P, De Vlieghe, S.** Comparison of five different methods to assess the concentration of boar semen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v.79, p.42-47, 2010.
- Maside, C, Recuero, S, Salas-Huetos, A, Ribas-Maynou, J, Yeste, M.** Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab. *Animal*, v.17, n.3, 100720, 2023.
- Mateo-Otero, Y., Fernández-López, P, Ribas-Maynou, J, et al.** Metabolite profiling of pig seminal plasma identifies potential biomarkers for sperm resilience to liquid preservation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.9, 669974, 2021.
- Menezes, TA, Bustamante-Filho, IC, Paschoal, AFL, et al.** Differential seminal plasma proteome signatures of boars with high and low resistance to hypothermic semen preservation at 5°C. *Andrology*, v.8, n.6, p.1907-1922, 2020.
- Ngo, CB, Morrell, JM, Tummaruk, P.** Boar semen microbiome: Insights and potential

implications. *Animal Reproduction Science*, v.272, 107647, 2025.

**Oehler, C, Janett, F, Schmitt, S, Malama, E, Bollwein, H.** Development of a flow cytometric assay to assess the bacterial count in boar semen. *Theriogenology*, v.133, p.125-134, 2019.

**Parrilla, I, Perez-Patiño, C, LIJ. et al.** Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology*, v.137, p.23-29, 2019.

**Pérez-Patiño, C, Parrilla, I, LI, J. et al.** The proteome of pig spermatozoa is remodeled during ejaculation. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.18, n.1, p.41-50, 2019.

**Pintado, B, De La Fuente, J, Roldan, ER.** Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.145-152, 2000.

**Purdy, PH, Graham, JK, Azevedo, H. C.** Evaluation of boar and bull sperm capacitation and the acrosome reaction using flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, v. 246, 106846, 2022.

**Quirino, M, Jakop, U, Mellagi, APG. et al.** A 5-color flow cytometry panel to assess plasma membrane integrity and mitochondrial activity. *Animal Reproduction Science*, v.247, 107076, 2022.

**Ramón, M, Martínez-Pastor, F.** Implementation of novel statistical procedures and other advanced approaches to improve analysis of CASA data. *Reproduction, Fertility and Development*, v.30, n.6, p.867-874, 2018.

**Savic, R, Petrovic, M, Ristic, Z, Gagrcin, M.** The effect of breed, boar and season on some properties of sperm. *Biotechnology in Animal Husbandry*, v.29, p.299-310, 2013.

**Schulze, M, Nitsche-Melkus, E, Jakop, U. et al.** New trends in production management in European pig AI centers. *Theriogenology*, v.137, p.88-92, 2019.

**Shrestha, A, Gaustad, AH, Øiaas, JB. et al.** Untargeted metabolomics reveals changes in boar sperm and seminal plasma metabolites associated with sexual maturity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.16, n.123, p.1-18, 2025.

**Soler, C, Alvarez, JG, Buendia, P. et al.** Afterword to sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian Journal of Andrology*, v.18, p.895, 2016.

**Song, C, Zhang, Z, Wei, Y. et al.** Proteomic analysis of boar sperm with differential ability of liquid preservation at 17 °C. *Theriogenology*, v.215, p.103-112, 2024.

**Souza, APB, Lopes, TN, Silva, AFT. et al.** Changes in porcine cauda epididymal fluid proteome by disrupting the HPT axis. *Molecular Reproduction and Development*, v.87, n.6, p.685-698, 2020.

**Sui, H, Sheng, M, Luo, H. et al.** Characterization of freezability-associated metabolites in boar semen. *Theriogenology*, v.196, p.88-96, 2023.

**Sui, H, Wang, S, Liu, G. et al.** Effects of Heat Stress on Motion Characteristics and Metabolomic Profiles of Boar Spermatozoa. *Genes*, v.13, 1647, p.1-12, 2022.

**Torres, MA, Díaz, R, Boguen, R. et al.** Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability. *PLoS One*, v.11, n.8, e0160988, 2016.

**Torres, MA, Pedrosa, AC, Novais, FJ. et al.** Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. *Biology of Reproduction*, v.106, n.1, p.213-226, 2022.

**Valverde, A, Mora, G, Rojas, M, Castro, N.** Efecto de la composición racial sobre la calidad espermática de verracos. *Agronomía Mesoamericana*, v.29, p.485, 2018.

**Vazquez, JM, Parrilla, I, Roca, J, Gil, MA, Cuello, C, Vazquez, JL, Martínez, EA.** Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.80-88, 2009.

**Viana, CHC, Jorge Neto, PN, Marques, MG.** Inseminação artificial em suínos no Brasil: biotecnologias e atualidades do mercado. *Suinocultura Industrial*, n.294, p.39-73, 2020.

**Viñolas-Vergés, E, Ribas-Maynou, J, Barranco, I. et al.** Chromatin condensation but not DNA integrity of pig sperm is greater in the sperm rich fraction. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.14, 139, 2023.

**Wang, S, Wang, Q, Zeng, X. et al.** 5-Aminolevulinic acid improves boar semen quality by enhancing the sperm mitochondrial function. *Theriogenology*, v.239, 117389, p.1-15, 2025.

**Weber, A, Argenti, LE, Souza, APB. et al.** Ready for the journey: a comparative proteome profiling of porcine cauda epididymal fluid and spermatozoa. *Cell and Tissue Research*, v.379, n.2, p.389-405, 2019.

**Winters, RA, Nettenstrom, LM, Lopez, DG. et al.** Effect of sorting boar spermatozoa by sex chromosomes on oviduct cell binding. *Theriogenology*, v.108, p.22-28, 2018.

**Yang, X, Nie, J, Zhang, Y. et al.** Genome-Wide Association Analysis of Boar Semen Traits Based on Computer-Assisted Semen Analysis and Flow Cytometry. *Animals*, v.15, n.1, 26, 2025.

**Yeste, M, Bonet, S, Rodriguez-Gil, JE, Barranco, I.** Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reproduction, Fertility and Development*, v.30, p.860-866, 2018.

**Zhang, Y, Yuan, W, Liu, Y. et al.** Plasma membrane lipid composition and metabolomics analysis of

---

Yorkshire boar sperms with high and low resistance to cryopreservation. *Theriogenology*, v.206, p.28-39, 2023.

---