

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

**“AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO FRENTE À HOMOGENEIZAÇÃO DE DOSES DE SÊMEN
SUÍNO ARMAZENADAS EM DIFERENTES DILUENTES”**

MARIANA BOSCATO MENEGAT

PORTO ALEGRE

2016

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

“AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO FRENTE À HOMOGENEIZAÇÃO DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO
ARMAZENADAS EM DIFERENTES DILUENTES”

Autor: Mariana Boscato Menegat

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

Orientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Menegat, Mariana Boscato

Avaliação de parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo frente à homogeneização de doses de sêmen suíno armazenadas em diferentes diluentes / Mariana Boscato Menegat. -- 2016.

72 f.

Orientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo.

Coorientadores: Ana Paula Gonçalves Mellagi, Ivo Wentz, Mari Lourdes Bernardi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

Armazenamento. 2. Cachaço. 3. Peroxidação lipídica. 4. Sistema CASA. 5. Viabilidade espermática. I. Bortolozzo, Fernando Pandolfo, orient. II. Mellagi, Ana Paula Gonçalves, coorient. III. Wentz, Ivo, coorient. IV. Bernardi, Mari Lourdes, coorient. V. Título

Mariana Boscato Menegat

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO FRENTE À HOMOGENEIZAÇÃO DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO
ARMAZENADAS EM DIFERENTES DILUENTES

Aprovado em 18 de Março de 2016.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Enefer Rosana Oberst

Membro da Comissão

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Membro da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gaspar e Jaqueline, por serem a base da minha vida, por sempre me incentivarem incondicionalmente a crescer e por nunca medirem esforços para que eu realizasse os meus sonhos.

À minha irmã, Angela, por ser minha amiga e companheira da minha vida, por trazer alegria para os meus dias.

Ao meu noivo, Henrique, por ser o meu maior incentivador e por sempre estar ao meu lado, multiplicando as minhas alegrias e minimizando as minhas angústias.

Ao meu orientador, Prof. Fernando Bortolozzo, por toda confiança depositada em mim durante o mestrado, pelas oportunidades, incentivos e aconselhamentos, e por ser um exemplo inspirador de mestre e profissional.

Aos meus coorientadores, Dr^a Ana Paula Mellagi, Prof. Ivo Wentz e Prof^a Mari Lourdes Bernardi pela dedicação incansável, orientação e ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. David Barcellos, pelos ensinamentos e experiências compartilhados.

Aos Profs. José Cláudio Moreira e Daniel Gelain pela incondicional disponibilidade laboratorial e técnica para a realização das análises de estresse oxidativo no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo. À toda equipe do laboratório 32, em especial ao Rafael Bortolin e à Amanda Vargas pela grande dedicação, paciência e comprometimento na realização de todas as análises.

Ao Setor de Suínos por me acolher e proporcionar um ambiente de trabalho excepcional. A todos os colegas da pós-graduação e graduação, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados. Especialmente àqueles que me auxiliaram e tanto se dedicaram aos meus experimentos: Ana Paula, Tila, Letícia, Guilherme, Giuliana, Elisar, Gabriela e Mariana. Carinhosamente às grandes amigas Letícia, Fernanda e Ana, pela amizade, cumplicidade e por tornarem os meus dias ainda melhores.

À ACSURS, principalmente à equipe da central de processamento de sêmen e ao Vanderlei Koboldt, pela parceria e por proporcionar os meios para a realização do meu experimento.

À Dália Alimentos, principalmente à equipe da central de processamento de sêmen e à Laura Argenti, pela parceria e por proporcionar os meios para a realização do meu experimento.

À Minitub do Brasil pelo apoio técnico e parceria.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À UFRGS pelo ensino gratuito e de qualidade.

RESUMO

AValiação DE PARâMETROS ESPERMÁTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO FRENTE À HOMOGENEIZAÇÃO DE DOSES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS EM DIFERENTES DILUENTES

Autor: Mariana Boscato Menegat

Orientador: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Coorientadores: Dr^a. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Prof. Ivo Wentz

Prof^a. Mari Lourdes Bernardi

A homogeneização das doses de sêmen suíno e a ressuspensão dos espermatozoides durante o armazenamento têm sido considerados como procedimentos benéficos para a qualidade espermática. Contudo, os fundamentos acerca dessa recomendação não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da homogeneização nos parâmetros espermáticos e *status* oxidativo das doses de sêmen suíno durante o armazenamento. Vinte e um ejaculados suínos normospérmicos foram diluídos em *split sample* nos diluentes Androstar[®] Plus (AND) e Beltsville Thawing Solution (BTS) e as doses de sêmen foram submetidas aos protocolos sem homogeneização (NoHom) ou com homogeneização manual duas vezes ao dia (2xHom) durante o armazenamento a 17°C por 168 h. Os parâmetros espermáticos foram avaliados de acordo com motilidade espermática, cinética espermática e integridade de membrana com as sondas fluorescentes SYBR-14/PI através do sistema CASA, integridade de acrossoma sob microscopia óptica com contraste de fase, teste de termorresistência a 38°C por 30 min e 120 min, e pH das doses de sêmen. O *status* oxidativo foi determinado pela peroxidação lipídica, oxidação proteica, teor de grupos sulfidríla, espécies reativas intracelulares, potencial antioxidante total e atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD). As doses inseminantes submetidas a NoHom ou 2xHom foram semelhantes ($P > 0,05$) na maioria dos parâmetros espermáticos e oxidativos avaliados, para ambos os diluentes. A NoHom foi superior ($P < 0,05$) à 2xHom quanto à motilidade e cinética espermáticas após o teste de termorresistência por 30 min, à manutenção do pH e à preservação da atividade da SOD. Além disso, melhores resultados nos parâmetros espermáticos e *status* oxidativo foram evidenciados no diluente AND em comparação ao BTS, exceto na motilidade total e progressiva, que diferiu apenas no final do período de armazenamento, e para espécies reativas intracelulares. Considerando que a homogeneização manual duas vezes ao dia não aprimorou a qualidade espermática e o *status* oxidativo, este procedimento não é necessário para o armazenamento de doses de sêmen normospérmicas por 168 h, tanto para o diluente Androstar[®] Plus quanto para o BTS.

Palavras-chave: armazenamento, cachaço, peroxidação lipídica, sistema CASA, viabilidade espermática.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF SPERM AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS UPON HOMOGENIZATION OF LIQUID-STORED BOAR SEMEN IN DIFFERENT EXTENDERS

Author: Mariana Boscato Menegat

Advisor: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-advisors: Dr^a. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Prof. Ivo Wentz

Prof^a. Mari Lourdes Bernardi

Homogenization of diluted boar semen and resuspension of spermatozoa during storage have always been regarded as beneficial for semen quality. Nevertheless, the fundamental basis for its recommendation remains unclear. The aim of this study was to verify the effect of homogenization on spermatic parameters and oxidative status of boar semen doses during storage. One normospermic ejaculate from each of 21 boars was diluted in a split sample design with Androstar[®] Plus (AND) and Beltsville Thawing Solution (BTS) and semen doses were submitted to no-homogenization (NoHom) or twice-a-day manual homogenization (2xHom) during storage at 17°C for 168 h. Spermatic parameters were assessed upon motility, kinematics and membrane integrity with SYBR-14/PI with CASA system, acrosome integrity under phase-contrast microscopy, thermoresistance test at 38°C for 30 min and 120 min, and pH. Oxidative status was determined by lipid peroxidation, protein oxidation, sulfhydryl content, intracellular reactive species, total radical-trapping antioxidant potential, and superoxide dismutase (SOD) activity. NoHom and 2xHom of liquid-stored semen doses were similar ($P > 0.05$) in most of the spermatic and oxidative parameters for both AND and BTS extenders. NoHom was superior ($P < 0.05$) to 2xHom regarding sperm motility and kinematics after thermoresistance test for 30 min, pH maintenance, and SOD activity preservation. Additionally, better results were evident for spermatic parameters and oxidative status in AND compared to BTS, except for total and progressive motility, which differed only at the end of the storage period, and intracellular reactive species. Taking into account that no beneficial effects for sperm motility traits and oxidative status were observed following twice-a-day homogenization, its use is not necessary for storage of semen doses for 168 h in both short- and long-term tested extenders.

Keywords: *CASA system, insemination doses, lipid peroxidation, sperm viability, storage.*

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas na Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Terminologia e descrição dos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo sistema CASA.....	20
Tabela 2. Comparativo da capacidade de preservação das características espermáticas de diluentes comerciais de sêmen suíno durante o armazenamento a 17°C.....	33

Tabelas inseridas no Artigo Científico

Table 1. Spermatic motion parameters after thermoresistance test (TRT) at 38°C for 30 min or 120 min according to homogenization of semen doses during storage (n=21).....	47
Table 2. Spermatic motion parameters after thermoresistance test (TRT) at 38°C for 30 min or 120 min according to extender (n=21).....	48
Supplemental Table 1. Composition of the extenders used for dilution of boar semen.....	56
Supplemental Table 2. Effect of homogenization, extender, storage time, and their interaction on sperm kinematic parameters.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas na Revisão Bibliográfica

Figura 1. Representação dos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo CASA.....	20
Figura 2. As consequências negativas do estresse oxidativo nos espermatozoides de mamíferos.....	27
Figura 3. Formação das espécies reativas de oxigênio (A) e ação das enzimas antioxidantes (B e C).....	28

Figuras inseridas no Artigo Científico

Figure 1. Timeline representing the sperm analysis performed in semen doses along storage time.....	40
Figure 2. Total and progressive sperm motility according to homogenization, extender and storage time.....	45
Figure 3. Effect of homogenization, extender, storage time, and interactions on oxidative stress assays in semen doses: thiobarbituric acid (TBA), carbonyl, dichlorofluorescein (DCF), and sulfhydryl (SH).....	50
Figure 4. Effect of homogenization, extender, storage time, and interactions on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and superoxide dismutase (SOD) activity in semen doses.....	51

LISTA DE ABREVIACOES

- ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça
- BCF – frequência com que o trajeto real cruza o trajeto médio
- BSA – albumina sérica bovina
- BTS – Beltsville Thawing Solution
- CASA – Sistema de Análise de Sêmen Computadorizada
- CAT – enzima catalase
- CO₂ – dióxido de carbono
- DAP – distância percorrida do trajeto médio
- DCF – corante fluorescente diacetato de carboxifluoresceína
- DCL – distância percorrida do trajeto real
- DSL – distância percorrida do trajeto em linha reta
- EDTA – cido etilenodiamino tetra-ctico
- ERO – espécies reativas de oxigênio
- EthD-1 – homodímero de etídio-1
- GPx – enzima glutaciona peroxidase
- GR – enzima glutaciona redutase
- H258 – sonda fluorescente Hoechst 33258
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- H342 – sonda fluorescente Hoechst 33342
- HEPES – cido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfônico
- IA – inseminaco artificial
- LIN – linearidade: relação entre VSL/VCL
- O₂⁻ – ânion superóxido
- OH – radical hidroxila
- PI – sonda fluorescente iodeto de propdeo
- RL – radicais livres
- SOD – enzima superóxido dismutase
- STR – retilinearidade: relação entre VSL/VAP
- TRIS – tris(hidroximetil)aminometano
- TTR – teste de termorresistência
- VAP – velocidade percorrida do trajeto médio
- VCL – velocidade percorrida do trajeto real

VSL – velocidade percorrida do trajeto em linha reta

WOB – wobble: relação entre VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Doses de sêmen suíno.....	15
2.2 Avaliação <i>in vitro</i> da qualidade espermática.....	17
2.2.1 Motilidade espermática	17
2.2.2 Morfologia espermática e integridade de acrossoma.....	20
2.2.3 Integridade de membrana.....	22
2.2.4 Estresse oxidativo.....	25
2.2.5 Teste de termorresistência.....	28
2.2.6 pH.....	29
2.3 Influência do armazenamento na qualidade espermática	30
2.3.1 Efeito da temperatura	30
2.3.2 Efeito do ar.....	31
2.3.3 Efeito do diluente	31
2.3.4 Efeito da sedimentação espermática	34
3. ARTIGO CIENTÍFICO	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
5. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A eficiência do desempenho reprodutivo na espécie suína foi notavelmente aprimorada nas últimas décadas no Brasil e no mundo. Esse avanço foi possibilitado pela consolidação e aplicação de conhecimentos em diversas áreas da suinocultura, sobretudo em nutrição animal, melhoramento genético, sanidade do plantel, estrutura de instalações e técnicas de manejo. A inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado é considerada a principal técnica aplicada ao manejo reprodutivo suíno e tem contribuído para o aperfeiçoamento de vários aspectos na produção suinícola (KNOX, 2016).

O desenvolvimento da IA em suínos foi acompanhado da adoção de estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva do plantel, consolidando os ganhos genéticos advindos do uso dessa biotécnica. Nesse sentido, o principal avanço foi obtido pela redução do número de espermatozoides por fêmea inseminada. Essa redução foi possibilitada pela aplicação de protocolos de IA com fins de diminuir o número de doses inseminantes por estro e pelo desenvolvimento da técnica de IA com deposição pós-cervical de um número reduzido de espermatozoides (BORTOLOZZO et al., 2015). Com isso, a qualidade da dose inseminante passa a ser essencial para garantir a alta eficiência reprodutiva alcançada. Para tanto, faz-se necessários programas rigorosos de garantia da qualidade espermática durante todo o processo de produção, distribuição e armazenamento das doses de sêmen, que sejam baseados em conhecimentos científicos recentemente desenvolvidos (RIESENBECK et al., 2015).

O armazenamento do sêmen suíno diluído é considerado um ponto crítico nos programas de garantia da qualidade espermática e constitui a etapa final do processo, que antecede a utilização da dose de sêmen para IA. Além disso, durante o armazenamento os espermatozoides estão suscetíveis aos efeitos de diversos fatores como diluição, temperatura, envelhecimento *in vitro*, presença de ar no interior da dose de sêmen, sedimentação espermática e manipulação das doses de sêmen. Considerando essas influências sobre a preservação dos espermatozoides, pretendeu-se investigar o efeito da homogeneização das doses de sêmen suíno ao longo do armazenamento. O ato de homogeneizar as doses inseminantes durante o armazenamento é atualmente praticado na maioria das granjas e centrais de processamento de sêmen. Entretanto, a divergência dos estudos sobre o tema (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995; SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015b) impede a tomada de decisões acerca da recomendação ou não desse procedimento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi

avaliar os parâmetros espermáticos e o estresse oxidativo frente à homogeneização ou não de doses de sêmen suíno conservadas em diluentes de curta e longa duração, ao longo do armazenamento a 17°C.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doses de sêmen suíno

A IA em suínos foi inicialmente desenvolvida no começo dos anos 1900 na Rússia, por Ivanow, sendo as pesquisas na área ampliadas durante a primeira metade do século XX. No entanto, a aplicação comercial da técnica de IA em suínos só foi estabelecida a partir dos anos 1980 (BORTOLOZZO et al., 2015). Atualmente, cerca de 90% das matrizes são inseminadas artificialmente nos principais países produtores de carne suína (RIESENBECK, 2011). Um fator determinante para o desencadeamento dessa mudança no cenário da suinocultura mundial foi o aprimoramento da produção de doses inseminantes (KNOX, 2016).

As doses inseminantes são preparadas a partir da diluição do sêmen *in natura* em um diluente de conservação, uma solução aquosa que visa manter a integridade e a capacidade fecundante dos espermatozoides por um determinado período de tempo (BUSSALLEU & TORNER, 2013). Para desempenhar essa função, a composição dos diluentes deve garantir funções básicas: manutenção do metabolismo espermático através do fornecimento de glicose; controle de pH por agentes tamponantes como bicarbonato de sódio, citrato de sódio, TRIS¹ e HEPES²; regulação da pressão osmótica do meio por sais como NaCl e KCl; e inibição do crescimento microbiano através da adição de antimicrobianos, principalmente aminoglicosídeos como a gentamicina (GADEA, 2003). Além disso, componentes adicionais podem ser incorporados aos diluentes. Substâncias quelantes como o EDTA³ capturam íons metálicos divalentes, principalmente o Ca²⁺, de modo a prevenir a capacitação espermática e a reação acrossomal prematura (JOHNSON et al., 2000). A BSA⁴ apresenta um efeito protetor das membranas e estimulador da motilidade espermática, provavelmente devido à capacidade da BSA de interagir com o colesterol modulando a fluidez da membrana plasmática (BUHR, 1990), de compensar o efeito da diluição das proteínas do plasma seminal e de controlar a peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2015). Antioxidantes como glutathiona, extratos de plantas e frutos, flavonoides, própolis e vitaminas, podem compensar a perda da capacidade antioxidante natural dos espermatozoides que ocorre

¹ TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

² HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfônico

³ EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

⁴ BSA: albumina sérica bovina

com a diluição do plasma seminal e o armazenamento das doses de sêmen (PETRUSKA et al., 2014).

A composição dos diluentes determina o tempo de conservação das células espermáticas, sendo que os diluentes podem ser classificados como de curta duração (até três dias), média duração (quatro a cinco dias) e longa duração (sete a dez dias) (GADEA, 2003). Os diluentes de curta duração, em especial o BTS⁵, são amplamente utilizados e podem ser considerados os diluentes de preferência em sistemas de produção com proximidade à central de processamento de sêmen e que rotineiramente utilizam a dose inseminante em até três dias após a coleta (KNOX, 2016). O BTS foi inicialmente desenvolvido para servir como meio de descongelamento (PURSEL & JOHNSON, 1975) e foi subsequentemente adaptado para o sêmen resfriado (JOHNSON et al., 1988), caracterizando-se por conter baixa quantidade de potássio. Os diluentes de média e longa duração também são largamente utilizados, ainda que as doses inseminantes raramente sejam usadas após o quarto dia de produção. Os principais benefícios dos diluentes de média e longa duração são as formulações aprimoradas com tampões anfóteros, protetores de membrana e antioxidantes, por exemplo, e que normalmente são mantidas em sigilo por razões comerciais. Além disso, a partir do emprego de diluentes de ampla duração, é possível realizar análises mais abrangentes nas doses de sêmen, tanto para avaliação da qualidade espermática quanto para controle sanitário (KNOX, 2016).

Independentemente do tipo de diluente empregado para a produção das doses de sêmen, os componentes devem prolongar a vida útil dos espermatozoides através da redução da atividade metabólica, a qual é favorecida pelo armazenamento em baixas temperaturas (BUSSALLEU & TORNER, 2013). No entanto, o espermatozoide suíno é extremamente sensível a baixas temperaturas e ao choque térmico pelo frio (PURSEL et al., 1973). A suscetibilidade ao choque térmico está relacionada à composição de fosfolipídeos e esteróis na membrana plasmática, os quais conferem fluidez e estabilidade à membrana, respectivamente (HOLT, 2000). Em baixas temperaturas, entre 5 a 15°C, ocorre uma transição de fase dos fosfolipídeos da membrana, reduzindo a fluidez da membrana (DROBNIS et al., 1993). Apesar de os esteróis controlarem as transições de fase, os espermatozoides suínos apresentam baixa relação colesterol:fosfolipídeos e distribuição assimétrica de colesterol na membrana, o que os

⁵ BTS: Beltsville Thawing Solution

torna mais sensíveis aos danos induzidos pelo resfriamento (DE LEEUW et al., 1990; PARKS & LYNCH, 1992), culminando, portanto, em desestabilização da permeabilidade da membrana e perda da integridade das membranas plasmática e acrossômica (DE LEEUW et al., 1990; WATSON, 2000). Em função dessa sensibilidade do espermatozoide suíno ao resfriamento, a criopreservação do sêmen é utilizada majoritariamente para conservação de material genético por tempo prolongado e transporte a longas distâncias. Enquanto isso, 99% das doses de sêmen suíno produzidas no mundo são utilizadas no estado líquido e conservadas entre 15 e 20°C (JOHNSON et al., 2000).

As doses de sêmen utilizadas para IA em suínos têm contribuído para o sucesso da técnica e para a eficiência da produção de suínos. As tendências atuais nesse âmbito estão voltadas para o uso eficiente dos ejaculados e para a produção responsável de doses de sêmen, principalmente através da redução no número de espermatozoides por dose inseminante e do controle microbiológico (RIESENBECK et al., 2015). Para tanto, altos padrões de qualidade devem ser exigidos durante o processamento e armazenamento do sêmen suíno, os quais podem ser estabelecidos a partir da avaliação consistente de diversos parâmetros espermatólogicos (JUNG et al., 2015; RIESENBECK et al., 2015).

2.2 Avaliação *in vitro* da qualidade espermática

Diversas razões para a infertilidade ou subfertilidade de reprodutores suínos podem ser atribuídas aos parâmetros quantitativos e qualitativos do sêmen. A qualidade espermática merece ser valorizada devido ao reduzido número de espermatozoides utilizado atualmente nas doses inseminantes para a IA e em função da influência da mesma no desempenho reprodutivo (JUNG et al., 2015).

2.2.1 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática é fundamental para determinar a qualidade do sêmen, visto que é um indicador de funcionamento do metabolismo espermático e de integridade das membranas (JOHNSON et al., 2000). Além disso, a motilidade é uma característica importante para a manutenção dos espermatozoides no lúmen do trato reprodutivo da fêmea, para a colonização do reservatório espermático na junção

uterotubárica e para a penetração da zona pelúcida no momento da fecundação (POLGE, 1978). A motilidade é um parâmetro utilizado para estabelecer o limite mínimo aceitável para o uso do sêmen na produção de doses inseminantes, sendo usualmente considerado o valor de referência de no mínimo 70% de motilidade espermática (BORTOLOZZO et al., 2005). A utilização de ejaculados com menos de 60% de espermatozoides móveis para produção de doses inseminantes afeta negativamente a taxa de penetração *in vitro*, a taxa de parto e o tamanho da leitegada, enquanto esses parâmetros se mantêm superiores e semelhantes entre os ejaculados com motilidade superior a 60% (FLOWERS, 1997).

A motilidade espermática tem sido avaliada quanto à associação com parâmetros de fertilidade. As motilidades total e progressiva no sêmen *in natura* já foram relacionadas com o tamanho da leitegada e com a taxa de parto, respectivamente (BROEKHUIJSE et al., 2012a). Entretanto, nem todos os trabalhos obtiveram tais resultados (DIDION, 2008). De fato, com a utilização de ejaculados com no mínimo 60-70% de espermatozoides móveis, a motilidade espermática *in natura* é capaz de explicar minimamente a variação na fertilidade; apenas 4% dentre os parâmetros relacionados ao macho e ao sêmen (BROEKHUIJSE et al., 2012b). A partir disso, foi proposto que a avaliação da motilidade espermática em doses de sêmen durante o armazenamento seria um melhor parâmetro preditivo da fertilidade (JUONALA et al., 1998; FOXCROFT et al., 2008). Alguns trabalhos seguindo essa linha de estudo encontraram relação entre a motilidade das doses de sêmen mantidas sob armazenamento a 17°C por até dez dias e a taxa de prenhez (SUTKEVICIENE et al., 2005), a taxa de parto (RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006) e o tamanho da leitegada (RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006; VYT et al., 2008). No entanto, deve-se considerar que o número de espermatozoides utilizados na dose inseminante pode influenciar a relação entre a motilidade espermática e a fertilidade *in vivo*, visto que um baixo número de espermatozoides móveis pode ser compensado pelo aumento dos espermatozoides totais na dose (FOXCROFT et al., 2008).

A qualidade da avaliação da motilidade espermática está intimamente relacionada à precisão do método utilizado (BROEKHUIJSE et al., 2011). Novas tecnologias foram desenvolvidas com o objetivo de permitir uma estimativa confiável e acurada das características de motilidade espermática, como é o caso dos sistemas de análise espermática computadorizada ou sistemas CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis systems*) (DOTT & FOSTER, 1979). Esse método de análise permite a avaliação simultânea da motilidade e da concentração espermática, além de possuir módulos de

análises complementares como morfologia, morfometria e integridade de membrana (VERSTEGEN et al., 2002). O sistema CASA é capaz de captar a movimentação de cada espermatozoide pelo deslocamento da cabeça, processar a informação da trajetória percorrida através de um computador e fornecer parâmetros a respeito da cinética individual dos espermatozoides e as médias de motilidade espermática (AMANN & KATZ, 2004). Atualmente, o sistema CASA consegue capturar imagens de 500 a 2000 espermatozoides em uma frequência de 50 a 60 quadros por segundo, finalizar a análise em menos de dois minutos e armazenar as informações detalhadas das análises, tornando-se um instrumento com ampla aplicabilidade comercial (AMANN & WABERSKI, 2014). Em relação à análise subjetiva realizada tradicionalmente através de um microscópio óptico, o sistema CASA permite uma avaliação objetiva da motilidade espermática e a padronização dos parâmetros de avaliação entre as amostras. Enquanto um técnico identifica variações de aproximadamente 10% de espermatozoides móveis na avaliação visual, o sistema CASA calcula a porcentagem de motilidade de forma contínua, o que contribui para a acurácia da análise (BROEKHUIJSE et al., 2011). Contudo, o sistema CASA requer padronizações e validações acerca da preparação da amostra de sêmen, treinamento de pessoal e ajustes técnicos para fornecer resultados confiáveis (AMANN & KATZ, 2004).

O sistema CASA avalia características detalhadas de motilidade, detectando mudanças sutis no movimento espermático (VYT et al., 2008). Os principais parâmetros de cinética espermática avaliados pelo CASA estão descritos na Tabela 1 e ilustrados na Figura 1. A importância de alguns desses parâmetros para a fecundação já foi estabelecida (GIL et al., 2009). Entretanto, a influência da cinética espermática sobre a predição da fertilidade ainda não foi bem determinada. Os parâmetros de deslocamento espermático avaliados pelo CASA já foram relacionados com a fertilidade *in vivo* avaliada pela taxa de parto e o tamanho da leitegada (HOLT et al., 1997; BROEKHUIJSE et al., 2012a; KUMMER et al., 2013), mas essa relação nem sempre é consistente (DIDION, 2008; VYT et al., 2008; McPHERSON et al., 2014). Além de sugerir avanços nos estudos na área, deve-se considerar que as divergências podem estar associadas às configurações dos diferentes sistemas CASA utilizados na mensuração dos parâmetros (BROEKHUIJSE et al., 2011).

Tabela 1. Terminologia e descrição dos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo sistema CASA.

Parâmetro	Unidade	Descrição
DCL	μm	Distância percorrida do trajeto real
DSL	μm	Distância percorrida do trajeto em linha reta
DAP	μm	Distância percorrida do trajeto médio
VCL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade percorrida do trajeto real
VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade percorrida do trajeto em linha reta
VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidade percorrida do trajeto médio
ALH	μm	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
BCF	Hz	Frequência com que o trajeto real cruza o trajeto médio
LIN	%	Linearidade: relação entre VSL/VCL
STR	%	Retilinearidade: relação entre VSL/VAP
WOB	%	Wobble: relação entre VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio

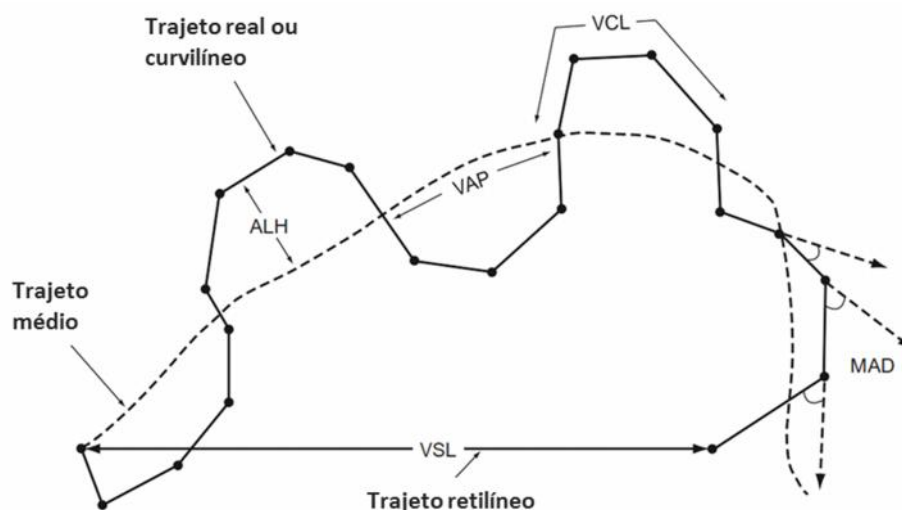


Figura 1. Representação dos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo CASA. Fonte: adaptado de WHO (2010).

2.2.2 Morfologia espermática e integridade de acrossoma

O ejaculado de reprodutores suínos saudáveis sempre contém certa proporção de espermatozoides morfologicamente anormais. Contudo, espera-se que o impacto sobre a fertilidade seja observado apenas quando as alterações excedem o limite considerado aceitável (JUNG et al., 2015). De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), os parâmetros considerados normais para o sêmen *in natura* e para a dose de sêmen resfriada são até 30% e 20% de alterações morfológicas totais, respectivamente. Quando individualizadas por região do espermatozoide, aceitam-se no máximo 5% de

defeitos de cabeça, acrossoma, colo ou peça intermediária e 10% de espermatozoides com gota citoplasmática proximal. A avaliação morfológica do sêmen compreende uma classificação qualitativa e quantitativa da morfologia dos espermatozoides. Para tal, podem ser utilizadas técnicas de coloração dos espermatozoides com eosina-nigrosina, Trypan blue, Giemsa ou Papanicolau, e visualização sob microscopia óptica (HANCOCK, 1956). Alternativamente, pode ser realizada a fixação dos espermatozoides em solução de formalina ou formol-citrato e avaliação da preparação úmida sob microscopia de contraste de fase, utilizando ou não o recurso de análise morfológica disponível em sistemas CASA (FOXCROFT et al., 2008).

A avaliação de morfologia espermática fornece uma estimativa do funcionamento do epitélio seminífero e da maturação espermática epididimária (GADEA 2005). A espermatogênese dura em torno de 34-36 dias e é seguida pela maturação dos espermatozoides no epidídimo, que leva cerca de 9-14 dias para ser completada. Portanto, uma espermatogênese completa ocorre a cada 45 a 65 dias na espécie suína (FLOWERS, 2004b), que é o intervalo recomendado para a realização dos exames periódicos de morfologia espermática (BORTOLOZZO et al., 2005).

Normalmente, as alterações morfológicas são atribuídas a falhas de origem genética, à imaturidade espermática ou à exposição dos espermatozoides a condições adversas (FLOWERS, 2004b). Os defeitos de acrossoma podem ocorrer durante a formação e maturação espermática, mas também estão particularmente associados às condições as quais os espermatozoides são expostos, como choque térmico, choque osmótico, dano mecânico e contaminação microbiana (FLOWERS, 2004a). O armazenamento do sêmen provoca danos funcionais aos espermatozoides, devido às condições de conservação e ao envelhecimento *in vitro* (PURSEL et al., 1974; WABERSKI et al., 2006). Durante o armazenamento, o acrossoma também pode ser comprometido pela capacitação espermática prematura, levando à exocitose das enzimas acrossômicas que exercem funções fundamentais na penetração do oócito durante a fecundação (FAZELI et al., 1997). Portanto, a avaliação da integridade de acrossoma é utilizada como um indicativo da viabilidade espermática e da qualidade do armazenamento das doses de sêmen (JOHNSON et al., 2000).

A partir da redução do número de espermatozoides utilizados para a IA, os defeitos morfológicos compensáveis passam a ser importantes para o desempenho reprodutivo, pois podem afetar a fertilidade (SAACKE et al., 2000). De fato, a capacidade dos espermatozoides se ligarem à tuba uterina para a formação do reservatório espermático

parece ser seletiva para espermatozoides com morfologia normal (PETRUNKINA et al., 2001). A morfologia espermática normal também já foi considerada como um dos principais fatores que afetam o tamanho da leitegada e o número de leitões nascidos vivos (McPHERSON et al., 2014). No entanto, quando as anormalidades estão dentro dos limites considerados aceitáveis, a morfologia espermática parece ter valor limitado para a predição da fertilidade (ALM et al., 2006; FEITSMA et al., 2009). A correlação entre anormalidades morfológicas e a fertilidade *in vitro* ou *in vivo* já foi encontrada para defeitos de acrossoma (KOPP et al., 2008), defeitos de cabeça (McPHERSON et al., 2014) e gotas citoplasmáticas (WABERSKI et al., 1994; XU et al., 1998; LOVERCAMP et al., 2007; KUMMER et al., 2013; SCHULZE et al., 2013b; McPHERSON et al., 2014).

2.2.3 Integridade de membrana

A membrana plasmática é essencial para a função e o metabolismo espermáticos (HARRISON, 1997). Por ser um requisito essencial à sobrevivência das células espermáticas, a integridade da membrana plasmática é um dos parâmetros mais importantes que devem ser considerados na avaliação da preservação do sêmen suíno ou na determinação da fertilidade de reprodutores (PINTADO et al., 2000). Os métodos de avaliação se baseiam na capacidade das membranas plasmáticas impedirem ou permitirem a entrada de determinados corantes ou sondas fluorescentes no interior da célula espermática. Assim, é possível diferenciar espermatozoides que possuam membranas íntegras e aqueles que apresentam danos à membrana plasmática, classificando-os em viáveis e não viáveis, respectivamente (SILVA & GADELLA, 2006). Os ejaculados suínos de alta qualidade devem possuir no mínimo 80-90% de espermatozoides com membranas intactas (JOHNSON et al., 2000).

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a integridade de membrana é através de colorações vitais. Na coloração de eosina-nigrosina, os espermatozoides com membranas danificadas são permeáveis à eosina e corados de rosa, diferenciando-se dos demais espermatozoides intactos que não são corados (HANCOCK, 1951). Esse método de avaliação apresenta vantagens por ser de execução simples e pouco oneroso, uma vez que pode ser realizado sob microscopia óptica convencional (SANCHO & VILAGRAN, 2013). A técnica de coloração utilizando corantes ou sondas fluorescentes permite maior confiabilidade nos resultados, mas requer o uso de microscópio de

fluorescência ou citômetro de fluxo (JOHNSON et al., 2000). Para a emissão de fluorescência, os corantes ou sondas devem ser excitados com raios ultravioleta, sendo que cada corante ou sonda fluorescente possui comprimentos de onda específicos para excitação e emissão, os quais são selecionados através de filtros (SILVA & GADELLA, 2006).

O princípio da fluorescência é o mesmo das colorações vitais, ou seja, através da exclusão do corante. Algumas sondas fluorescentes são permeáveis às membranas plasmáticas, como é o caso do diacetato de carboxifluoresceína (DCF) (GARNER et al., 1986), Hoechst 33342 (H342) (VÁZQUEZ et al., 2002) e SYBR-14 (GARNER & JOHNSON, 1995). A permeabilidade à membrana se deve ao grupamento acetila que confere às sondas a característica anfipática. Contudo, as sondas são desacetiladas por esterases intracelulares imediatamente após adentrarem a célula espermática, o que as tornam impermeáveis à membrana plasmática e as impedem de sair das células viáveis (SILVA & GADELLA, 2006). Enquanto isso, outras sondas, como iodeto de propídeo (PI), Hoechst 33258 (H258), Yo-Pro-1 e homodímero de etídio-1 (EthD-1), são impermeáveis à membrana e capazes de penetrar somente espermatozoides com membranas danificadas, adquirindo propriedades fluorescentes ao se ligarem ao DNA das células inviáveis (GILLAN et al., 2005).

A principal combinação de sondas fluorescentes utilizada para avaliar a viabilidade espermática é SYBR-14 e PI (SUTOVSKY, 2015). O método já foi descrito e provado eficiente para diversas espécies de mamíferos (GARNER & JOHNSON, 1995). O SYBR-14 emite fluorescência de cor verde (excitação/emissão de 488/515 nm de comprimento de onda) e indica os espermatozoides viáveis, enquanto o PI identifica os espermatozoides inviáveis pela fluorescência de cor vermelha (excitação/emissão de 488/>620 nm de comprimento de onda). Ambos são sondas fluorescentes nucleares, pois a ligação aos ácidos nucleicos do DNA confere propriedades fluorescentes às sondas (GARNER & JOHNSON, 1995). A principal vantagem que torna esse método amplamente utilizado é a determinação simultânea de espermatozoides viáveis e inviáveis em uma mesma amostra (JOHNSON et al., 2000). Além disso, não requer precisão no tempo de incubação porque as sondas são mais estáveis, atingindo um equilíbrio com o DNA em aproximadamente 15 minutos, e praticamente não produzem coloração de fundo (GARNER & JOHNSON, 1995).

Como mencionado anteriormente, os métodos de avaliação da integridade da membrana utilizando corantes ou sondas fluorescentes devem ser associados à

microscopia óptica de fluorescência ou citometria de fluxo. O microscópio é mais simples e acessível para adquirir e operar, entretanto fornece uma avaliação subjetiva e laboriosa (WOELDERS, 1991; SUTOVSKY, 2015). O citômetro de fluxo, por sua vez, permite o processamento rápido, automático e objetivo das amostras, avaliando mais de 10.000 espermatozoides por análise (WABERSKI et al., 2011). Porém, requer alto investimento para aquisição e manutenção periódica, além do preparo minucioso das amostras para evitar a obstrução do equipamento (ALTHOUSE & HOPKINS, 1995; SUTOVSKY, 2015). Com vistas à aplicabilidade rotineira em centrais de processamento de sêmen, métodos de avaliação da integridade de membrana que sejam menos demorados do que a microscopia e com menor custo do que a citometria de fluxo estão sendo desenvolvidos. A utilização dos sistemas CASA equipados com módulos de viabilidade espermática representa um potencial para ampliar a aplicação dessa análise (AMANN & WABERSKI, 2014).

Apesar da evidente importância da preservação de membranas íntegras para a capacidade fecundante dos espermatozoides, poucos trabalhos têm correlacionado a integridade de membrana com a fertilidade *in vivo* (JUONALA et al., 1998; JUONALA et al., 1999; CHRISTENSEN et al., 2004; SUTKEVICIENE et al., 2009). A estrutura da membrana plasmática não parece estar intimamente relacionada com a fertilidade (GADEA et al., 1998; TARDIF et al., 1999; GADEA et al., 2004), mas mais estudos com corantes ou sondas fluorescentes recentemente desenvolvidos se fazem necessários. Na realidade, a integridade de membrana é um indicador da viabilidade, mas não da funcionalidade espermática (GADEA, 2005). O potencial de fertilidade espermática pode ser estimado com maior eficiência quando vários parâmetros seminais são combinados, por isso, recentemente, estão sendo propostos métodos de marcações fluorescentes múltiplas (BUSSALEU et al., 2005; SCHULZE et al., 2013b). Dessa forma, é possível avaliar simultaneamente o *status* do DNA, acrossoma, mitocôndria e membrana plasmática das células espermáticas (BUSSALEU et al., 2005). De fato, a viabilidade espermática apresenta correlação com a integridade de acrossoma e a atividade mitocondrial (HUO et al., 2002) e parece estar relacionada à fragmentação de DNA (BOE-HANSEN et al., 2008).

2.2.4 Estresse oxidativo

A mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos espermatozoides é um importante indicador da qualidade espermática (SUTOVSKI et al., 2015). As ERO são produzidas a partir do metabolismo celular normal e compreendem todos os radicais de oxigênio, sendo alguns radicais livres (RL). Os RL são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo alta reatividade à molécula (AITKEN et al., 2014). As principais ERO produzidas pelos espermatozoides de mamíferos são o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GUTHRIE & WELCH, 2012), os quais são gerados majoritariamente pelas mitocôndrias (KOPPERS et al., 2008). A cadeia mitocondrial tende a perder 2% dos elétrons durante a respiração celular, levando à conversão do oxigênio em ânion superóxido (O_2^-) (BOVERIS & CHANCE, 1973). No sêmen, a principal fonte de ERO são os espermatozoides imaturos (OLLERO et al., 2001) ou com defeitos morfológicos (BALL et al., 2001) e os leucócitos (AITKEN et al., 1996). Na ausência de geradores de ERO, o ejaculado suíno recém-coletado apresenta níveis basais considerados baixos, com menos de 4% dos espermatozoides afetados pela formação de ERO, indicando um controle eficiente do sistema de redução-oxidação (GUTHRIE & WELCH, 2006). No entanto, a preservação do sêmen suíno tende a ser crítica para o controle do dano oxidativo aos espermatozoides (KUMARESAN et al., 2009).

A produção de ERO em baixas quantidades desempenha um papel importante no processo de fecundação, durante a capacitação espermática, hiperativação, integridade acrossômica e fusão com o oócito (AWDA et al., 2009). No entanto, a geração excessiva de ERO além do limite das defesas antioxidantes dos espermatozoides induz ao estado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é consequência de alterações no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante a favor do *status* oxidante, podendo ser causado pela produção elevada de ERO ou pela redução na quantidade de antioxidantes (SIES, 1985). Os espermatozoides de mamíferos apresentam alta vulnerabilidade ao estresse oxidativo, devido à sua ultraestrutura e composição bioquímica. Primeiramente, as células espermáticas possuem um citoplasma escasso em comparação à maioria das células, o que enfraquece o sistema intracelular enzimático de defesa antioxidante (AITKEN et al., 2010). Além disso, a membrana plasmática dos espermatozoides apresenta uma alta concentração de ácidos graxos polinsaturados, alvos preferenciais

dos RL (PARKS & LYNCH, 1992; CEROLINI et al., 2000; BROWNEERS et al., 2005). Por fim, os espermatozoides possuem deficiência na enzima catalase, que participa da defesa antioxidante intracelular (BILODEAU et al., 2000).

A suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo acarreta em danos à estrutura e função das células espermáticas, uma vez que, sob condições oxidativas extremas, os lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos são alvos potenciais das ERO. O primeiro componente da célula espermática atingido pelas ERO é a membrana plasmática, devido à abundância de substrato para a peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2000). A lipoperoxidação danifica a estrutura dos fosfolipídeos da membrana plasmática, levando à perda da fluidez e da integridade da membrana (AITKEN et al., 1993). Além dos danos peroxidativos na membrana plasmática, as ERO estão relacionadas a danos ao DNA nuclear, sendo considerado uma das principais causas de fragmentação de DNA nos espermatozoides (AITKEN et al., 1998; DE IULIIS et al., 2009). O metabolismo espermático também é afetado pela lipoperoxidação devido à depleção de ATP induzida pelas ERO, culminando em redução da motilidade espermática (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; GUTHRIE et al., 2008). Quando tomadas em conjunto, as consequências do estresse oxidativo nos espermatozoides compreendem desde a perda da função espermática, devido à quebra da integridade da membrana plasmática, até a morte celular causada por danos ao DNA espermático nuclear (Figura 2; AITKEN et al., 2014).

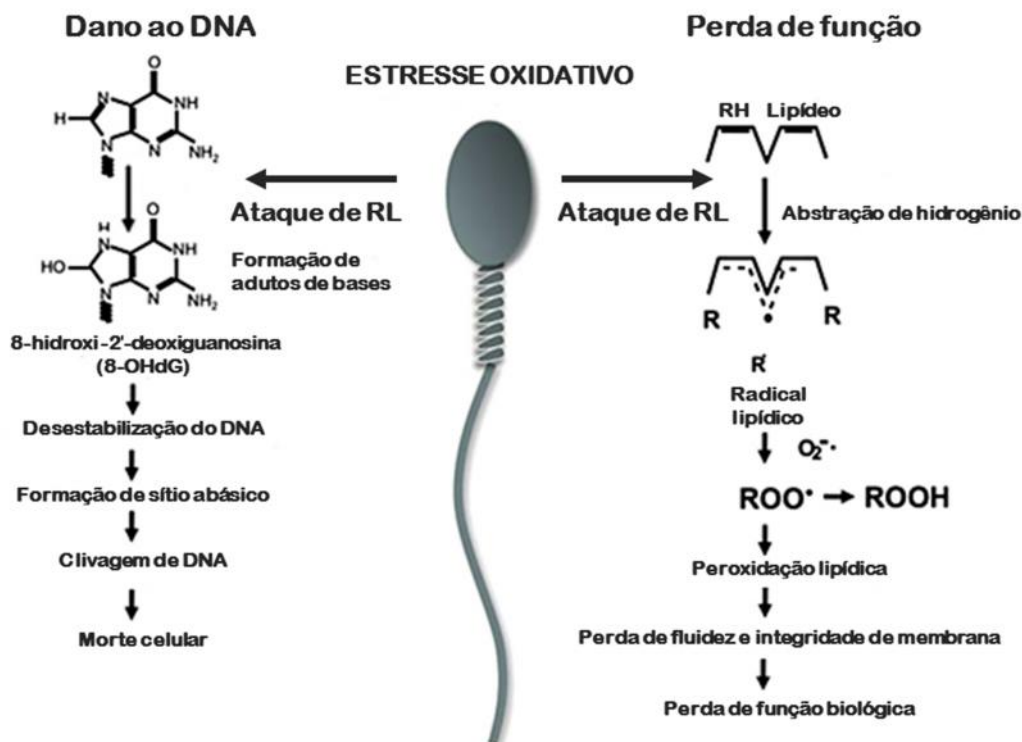


Figura 2. As consequências negativas do estresse oxidativo nos espermatozoides de mamíferos. Fonte: adaptado de Aitken et al. (2014).

A proteção contra os efeitos da formação de ERO é realizada por um sistema intra e extracelular de defesa antioxidante, tanto enzimático como não enzimático. Os espermatozoides de mamíferos contam principalmente com a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase (CAT). As enzimas antioxidantes catalisam reações que neutralizam os RL e as ERO, convertendo-os em moléculas inofensivas (Figura 3; CHAMPE et al., 2006). O plasma seminal é considerado a principal fonte de antioxidantes, que são substâncias capazes de atuar como cofatores de enzimas antioxidantes ou de agir diretamente na neutralização de RL, reduzindo o estresse oxidativo (AITKEN, 1995). No sistema antioxidante seminal, destacam-se as próprias proteínas do plasma seminal e os antioxidantes de baixo peso molecular: ácido úrico, albumina, taurina, glutathiona e outros tiois (-SH), vitamina E (-tocoferol) e vitamina C (ácido ascórbico) (STRZE EK et al., 1999).

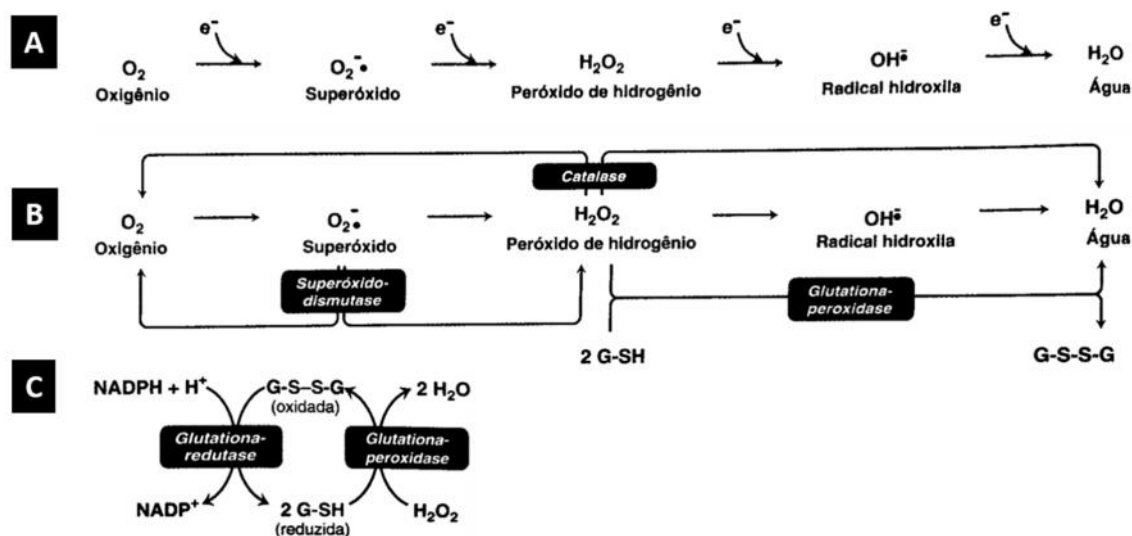


Figura 3. Formação das espécies reativas de oxigênio (A) e ação das enzimas antioxidantes (B e C). Fonte: adaptado de Champe et al. (2006).

Recentemente, o estresse oxidativo vem sendo tema de diversas pesquisas na reprodução de suínos. O perfil lipídico da membrana dos espermatozoides e o *status* antioxidante do plasma seminal foram associados a diferenças na motilidade espermática no sêmen *in natura*, classificado como de baixa (< 60%) ou alta (> 60%) motilidade (AM-IN et al., 2011). Já em um estudo sobre os efeitos do armazenamento de doses de sêmen a 18°C, foi constatado que a peroxidação lipídica ocorre durante a preservação do sêmen, e que a mesma afeta negativamente a motilidade, integridade de membrana e de acrossoma (KUMARESAN et al., 2009). Em relação à fertilidade de reprodutores, a identificação de proteínas específicas do plasma seminal através de análise proteômica permitiu diferenciar reprodutores de baixa e alta fertilidade *in vivo*. Dentre essas proteínas, a GPx5 foi relacionada, sugerindo a influência do estresse oxidativo na fertilidade (MAY et al., 2015). Além disso, diversos estudos têm avaliado a suplementação de antioxidantes na dieta de reprodutores (LOVERCAMP et al., 2013; PETRUJKI et al., 2014; LIU et al., 2015) ou nos diluentes que compõe as doses de sêmen (MENDEZ et al., 2013; LEE & PARK, 2015) e os efeitos que exercem na qualidade espermática.

2.2.5 Teste de termorresistência

O teste de termorresistência (TTR) foi desenvolvido para avaliar a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea e a habilidade de

preservação da fertilidade (TARDIF et al., 1999). A exposição dos espermatozoides a um teste de resistência térmica pode revelar danos latentes que não aparecem imediatamente após a ejaculação e processamento do sêmen (FISER et al., 1991). Originalmente, o TTR foi utilizado para estudar o metabolismo espermático no sêmen *in natura* (FOLEY et al., 1964) e a qualidade espermática no sêmen criopreservado (LARSSON & ERSMAR, 1980). Atualmente, é um método que pode ser adotado para a avaliação da competência funcional dos espermatozoides quando submetidos a condições que simulam a temperatura corporal da espécie suína (TARDIF et al., 1999).

Os protocolos aplicados no TTR utilizam a incubação de 10 mL de sêmen ou dose inseminante em banho-maria a 37°C por 180 min (LARSSON & ERSMAR, 1980), a 42,5°C por 45 min (FISER et al., 1991) ou, em protocolos recentemente modificados por Schulze et al. (2013a), a 38°C por 30 min e 300 min. Após o período de incubação, as amostras são avaliadas quanto a parâmetros espermáticos, como motilidade, integridade de membrana e acrossoma (LARSSON & ERSMAR, 1980; TARDIF et al., 1999).

Apesar de anteriormente não ter sido relacionado com a fertilidade (TARDIF et al., 1999), recentemente o TTR parece ser um método capaz de auxiliar na predição da fertilidade através da avaliação espermática. Utilizando o TTR a 38°C por 30 min e 300 min, Schulze et al. (2013b) observaram que algumas características de cinética espermática analisadas no sistema CASA são parâmetros relevantes para predizer a fertilidade. Além disso, a aplicação do teste de resistência térmica durante o período de armazenamento das doses de sêmen parece ser importante para avaliar a qualidade espermática (SCHULZE et al., 2013b; 2015a; 2015b).

2.2.6 pH

O pH do sêmen suíno varia entre 7,2 e 7,5, mas os diluentes apresentam um pH próximo à neutralidade para favorecer a redução do metabolismo e da motilidade durante o armazenamento das doses (JOHNSON et al., 2000). O pH interno do espermatozoide é influenciado pelo pH do meio e este, por sua vez, está correlacionado diretamente com a motilidade espermática (GATTI et al., 1993). Durante a manutenção dos espermatozoides na cauda do epidídimo, o pH 6,5 do meio mantém a motilidade severamente reduzida. Todavia, quando as secreções das glândulas acessórias são incorporadas durante a ejaculação, o aumento do pH torna os espermatozoides

completamente móveis (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1990). Ao longo do armazenamento das doses inseminantes, porém, o aumento do pH está associado à redução na motilidade espermática (VYT et al., 2004; VYT et al., 2007; SCHULZE et al., 2015b). Isso porque os espermatozoides que são mantidos em meios com pH elevado apresentam maior motilidade basal durante o armazenamento, provocando gasto de energia, depleção de nutrientes e, finalmente, exaustão espermática (JONES & BAVISTER, 2000). Por outro lado, a acidificação do pH pode ser um indicativo de contaminação bacteriana (VYT et al., 2004).

A flutuação do pH durante o armazenamento das doses de sêmen é um indicador importante de preservação e qualidade espermática. O pH do sêmen diluído aumenta cerca de 0,3 a 0,5 nos três primeiros dias de armazenamento. Portanto, os diluentes de longa duração devem conter uma capacidade tamponante superior às demais (VYT et al., 2004). A avaliação do pH nas doses inseminantes armazenadas permitiu evidenciar o efeito da presença de ar em contato com o sêmen diluído (VYT et al., 2007) e da homogeneização das doses de sêmen na qualidade espermática (SCHULZE et al., 2015b).

2.3 Influência do armazenamento na qualidade espermática

A preservação do sêmen suíno após a ejaculação exerce efeito sobre a função espermática, principalmente devido à diluição, resfriamento e condições de armazenamento aos quais os espermatozoides são submetidos. O envelhecimento espermático que ocorre naturalmente durante a conservação dos espermatozoides *in vitro* influencia fundamentalmente esse processo (JOHNSON et al., 2000; WABERSKI et al., 2011).

2.3.1 Efeito da temperatura

A temperatura de armazenamento das doses de sêmen é um ponto crítico para a qualidade espermática devido à sensibilidade térmica dos espermatozoides suínos. O ideal é conservar as doses inseminantes a uma temperatura constante dentro dos limites de 15°C a 20°C, evitando flutuações de temperatura (JOHNSON et al., 2000). A variação de 2°C a 3°C na temperatura de armazenamento pode afetar a motilidade espermática (YOUNG et al., 2005) e representar a redução de até um dia na vida útil das

doses inseminantes (ROZEBOOM, 2003). O principal motivo pelo qual a oscilação de temperatura é prejudicial à função espermática está relacionado com a indução de alterações na fluidez da membrana plasmática (DE LEEUW et al., 1990). A conservação das doses de sêmen em temperaturas abaixo de 15°C ou acima de 20°C também afeta a qualidade espermática, principalmente devido às modificações na membrana plasmática e no metabolismo espermático, respectivamente (YOUNG et al., 2005).

2.3.2 Efeito do ar

A presença de ar no interior das doses inseminantes é verificada quando a capacidade da embalagem é superior ao volume da dose produzida. Considerando as tecnologias atualmente empregadas na produção de doses de sêmen, cerca de 10% do volume total da embalagem é preenchido por ar (VYT et al., 2007). Com a produção de doses inseminantes de volume reduzido para IA intrauterina, a proporção de ar pode ser superior se for utilizada a mesma embalagem das doses para IA intracervical. Entretanto, a manutenção de ar no interior das doses inseminantes traz prejuízo à qualidade espermática, sendo recomendado o preenchimento completo das embalagens com sêmen diluído (VYT et al., 2007; AUSEJO et al., 2015). A presença de ar durante o armazenamento propicia a perda de CO₂ do sêmen diluído para o compartimento com ar, provocando a elevação do pH do meio e comprometendo a motilidade espermática (VYT et al., 2007; AUSEJO et al., 2015). Além disso, o contato do ar com o sêmen diluído favorece a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, aumenta os danos oxidativos ao longo do armazenamento (AUSEJO et al., 2015).

2.3.3 Efeito do diluente

O diluente é um componente fundamental para a preservação do sêmen suíno. Atualmente, estima-se que 12,8 milhões de litros de diluentes sejam utilizados por ano no mundo todo (SCHULZE et al., 2015a). A qualidade espermática pode ser afetada pela preparação inadequada dos diluentes, como a mensuração imprecisa da quantidade do diluente em pó e da água purificada para diluição, acarretando em desequilíbrio osmótico (SCHULZE et al., 2015a). Entretanto, mesmo com a garantia da produção adequada do diluente, a preservação do sêmen diluído provoca mudanças morfológicas

e funcionais semelhantes ao processo natural de envelhecimento espermático, sendo que a intensidade desse processo pode ser determinada pelas condições e pelo tempo de armazenamento (DE AMBROGI et al., 2006).

O BTS é o diluente mais utilizado mundialmente. Por ser vastamente conhecido e ter a sua formulação prontamente disponível, o BTS serve como parâmetro para comparação com novos diluentes (GADEA, 2003). Os diluentes de longa duração foram desenvolvidos a partir da adição de novos componentes ao meio, a fim de preservar os espermatozoides com maior eficiência e por um período prolongado (GADEA, 2003). A avaliação da qualidade espermática frente a diluentes comerciais de conservação é tópico de diversos estudos, sendo os mais recentes expostos na Tabela 2. De fato, verifica-se o efeito da composição do diluente sobre as características espermáticas. Contudo, não há um consenso acerca da superioridade dos diluentes de média e longa duração em relação aos de curta duração. Além disso, a influência do diluente sobre a fertilidade *in vitro* ou *in vivo* permanece pouco explorada (PINART et al., 2015).

Tabela 2. Comparativo da capacidade de preservação das características espermáticas de diluentes comerciais de sêmen suíno durante o armazenamento a 17°C.

Diluentes	Duração*	Parâmetros avaliados	Análises	Resultados	Autores
BTS	3	Motilidade (CASA), integridade de membrana, funcionalidade espermática, fosforilação proteica	Até 288 h	Androhep® Plus foi superior ao BTS nos parâmetros avaliados.	Dubé et al. (2004)
Androhep® Plus	7				
BTS	3	Motilidade, morfologia, pH, contaminação bacteriana	Até 168 h	Mulberry III foi superior aos demais diluentes de longa duração. Os diluentes de curta duração preservaram os parâmetros avaliados no período proposto pelo fabricante.	Vyt et al. (2004)
Kobidil+	3				
Androhep®	7				
Acromax	7 a 8				
Mulberry III	7 a 14				
BTS	3	Motilidade, integridade de membrana, integridade de acrossoma, fluidez e assimetria de fosfolipídeos da membrana	72 h e 120 h	Os diluentes de longa duração foram superiores ao BTS na preservação da integridade de membranas.	Waterhouse et al. (2004)
X-Cell™	6				
Mulberry III	7 a 14				
BTS	3	Motilidade (CASA), integridade de membrana, integridade de cromatina	Até 96 h	Os diluentes apresentaram resultados semelhantes nos parâmetros avaliados.	De Ambrogi et al. (2006)
X-Cell™	6				
MR-A	6 a 7				
BTS	3	Motilidade (CASA), pH, integridade de membrana, integridade de acrossoma, assimetria de fosfolipídeos da membrana, níveis de cálcio intracelular, atividade de acrosina, fertilidade <i>in vivo</i>	48 h	Duragen foi superior ao BTS na motilidade progressiva e integridade de membrana, mas foram semelhantes no desempenho reprodutivo.	Pinart et al. (2015)
Duragen	10				

*Duração do diluente recomendada pelo fabricante, em dias.

2.3.4 Efeito da sedimentação espermática

A sedimentação espermática ocorre devido ao repouso das doses de sêmen durante o armazenamento, fazendo com que os espermatozoides, microrganismos e outras partículas presentes na dose sejam depositados pela ação da gravidade. A formação de sedimento é considerada prejudicial à qualidade espermática, possivelmente devido ao acúmulo de metabólitos e à depleção da capacidade tamponante do diluente (BELSTRA, 2007). A homogeneização ou rotação das doses de sêmen durante o armazenamento é uma prática comum nas granjas e centrais de processamento de sêmen, sendo recomendada para ressuspender os espermatozoides em sedimentação. Além disso, é uma oportunidade para conferir o funcionamento da conservadora de sêmen e o inventário de doses inseminantes (BELSTRA, 2007). No entanto, os estudos acerca da sedimentação espermática são escassos e apresentam resultados conflitantes (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995; SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015b).

O efeito benéfico da rotação das doses de sêmen pode estar relacionado à ressuspensão dos espermatozoides do sedimento e à redistribuição uniforme dos componentes do diluente (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995). De fato, a conservação de doses de sêmen em rotação automática permanente (300 rotações por minuto) favoreceu a qualidade espermática em comparação ao armazenamento sem rotação, como pôde ser verificado pelo aumento da motilidade espermática, viabilidade espermática, percentual de acrossomas normais e resistência osmótica (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995). Entretanto, nem sempre os efeitos favoráveis da rotação das doses de sêmen são observados (SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015b). A motilidade espermática e o percentual de acrossomas normais foram semelhantes entre as doses de sêmen submetidas à rotação constante, à rotação manual uma vez ao dia e à ausência de rotação por até três dias de armazenamento, demonstrando que a sedimentação espermática pode não ser deletéria. Pelo contrário, a rotação constante das doses de sêmen acabou sendo prejudicial à motilidade espermática após cinco dias de armazenamento (SIMMET et al., 1998).

Recentemente, a rotação de doses inseminantes durante o armazenamento foi relacionada adversamente à qualidade espermática, de modo que a recomendação de homogeneização das doses está sendo desencorajada (SCHULZE et al., 2015b). Em comparação ao armazenamento das doses de sêmen sem rotação, a conservação em rotação manual duas vezes ao dia ou em rotação automática permanente (cinco rotações

por hora) resultou em alcalinização do sêmen diluído, redução da integridade de membrana, e alterações nos parâmetros de motilidade e cinética espermáticas, as quais se tornaram evidentes após o teste de resistência térmica (SCHULZE et al., 2015b). O efeito prejudicial da rotação espermática pode ser parcialmente explicado pela perda acentuada de CO₂ do sêmen diluído para o compartimento com ar devido à agitação das doses, induzindo ao aumento do pH do meio (VYT et al., 2007). Todavia, os mecanismos capazes de esclarecer a real influência da sedimentação na qualidade dos espermatozoides mantidos sob armazenamento permanecem desconhecidos. Especula-se que a formação de um sedimento crie um microambiente benéfico para a manutenção da longevidade espermática ou então que a rotação das doses de sêmen exacerbe o estresse oxidativo (SCHULZE et al., 2015b).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO A SER SUBMETIDO

Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders

Menegat M. B.¹, Bortolin R. C.², Menezes T. A.¹, Mellagi A. P. G.¹, Bernardi M. L.³,
Wentz I.¹, Moreira J. C. F.², Bortolozzo F. P.^{1*}

¹*Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, Brazil;*

²*Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, RS, Brazil;*

³*Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS, Brazil.*

*Corresponding author: fpbortol@ufrgs.br

ABSTRACT

Homogenization of diluted boar semen and resuspension of spermatozoa during storage have always been regarded as beneficial for semen quality. Nevertheless, the fundamental basis for its recommendation remains unclear. The aim of this study was to verify the effect of homogenization on spermatoc parameters and oxidative status of boar semen during storage. One normospermic ejaculate from each of 21 boars was diluted in a split sample design with Androstar[®] Plus (AND) and Beltsville Thawing Solution (BTS) and semen doses were submitted to no-homogenization (NoHom) or twice-a-day manual homogenization (2xHom) during storage at 17°C for 168 h. Spermatoc parameters were assessed upon motility, kinematics and membrane integrity with SYBR-14/PI with CASA system, acrosome integrity under phase-contrast microscopy, thermoresistance test at 38°C for 30 min and 120 min, and pH. Oxidative status was determined by lipid peroxidation, protein oxidation, sulfhydryl content, intracellular reactive species, total radical-trapping antioxidant potential, and superoxide dismutase (SOD) activity. NoHom and 2xHom of liquid-stored semen doses were similar ($P>0.05$) in most of the spermatoc and oxidative parameters for both AND and BTS extenders. NoHom was superior ($P<0.05$) to 2xHom regarding sperm motility and kinematics after thermoresistance test for 30 min, pH maintenance, and SOD activity preservation. Additionally, better results were evidenced on spermatoc parameters and oxidative status in AND compared to BTS, except for total and progressive motility, which differed only at the end of the storage period, and intracellular reactive species. Taking into account that no beneficial effects for sperm motion traits and oxidative status were observed following twice-a-day homogenization, its use is not necessary for storage of semen doses for 168 h in both short- and long-term tested extenders.

Keywords: CASA system, insemination doses, lipid peroxidation, sperm viability, storage.

Introduction

Extension and liquid-storage of boar semen is the standard method for sperm preservation and artificial insemination (RIESENBECK, 2011). Storage of extended semen is limited at 15-20°C for up to 3-10 days, which represents a challenge for sperm quality maintenance (JOHNSON et al., 2000). This temperature range defines a raised sperm metabolic rate and an ineffective inhibition of bacteria growth compared to lower storage temperatures (GADEA, 2003). Moreover, prolonged spermatoc life beyond this period is a restriction for currently available extenders (PINART et al., 2015). At the same time, current tendencies to reduce the sperm number per insemination dose, to prolong semen storage time, and to adopt responsible methods for bacterial control, demand a strict quality assurance during semen storage (RIESENBECK et al., 2015).

Liquid-storage of boar semen is influenced by several factors including dilution rate (SCHULZE et al., 2015a), extender (PINART et al., 2015), temperature stability inside the storage unit (YOUNG et al., 2005), air presence into the semen dose (VYT et al., 2007; AUSEJO et al., 2015), *in vitro* ageing (DE AMBROGI et al., 2006), and handling of semen doses (LEAHY & GADELLA, 2011). Sperm sedimentation is listed as an important factor influencing liquid semen preservation. Resting semen doses during storage allows spermatozoa, microorganisms, and particles to be gradually deposited into sediment (BELSTRA, 2007). For resuspending sperm cells, manual homogenization of extended semen doses is widely practiced and recommended. Nevertheless, its consequences on sperm quality have not been completely elucidated (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995; SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015b). Recently, the state of oxidative stress was speculated as the underlying mechanism for explaining the role of homogenization on semen doses quality (SCHULZE et al., 2015b).

The present study evaluated the effect of homogenization on sperm parameters and oxidative status during storage of boar semen. This study also considered different extenders (short- and long-term) and prolonged storage time (168 h) for comparisons. Overall, we aimed to clarify whether the current recommendation of daily manual homogenization of stored semen doses has an impact on sperm quality, for the first time here assessed by oxidative stress analysis.

Material and Methods

Animals and facilities

One normospermic ejaculate from each of 21 crossbred PIC[®] Génétiporc boars (Pietran × Duroc) from a commercial boar stud was used in the study. The boars were healthy, mature, and were housed in individual crates in a temperature-controlled barn (16-18°C). All boars had *ad libitum* access to water and were fed a commercial corn-soybean meal diet. The boars were routinely used for production of semen doses, with 6.1±0.9 days of interval between semen collections.

Semen collection and processing

Ejaculates were collected in a semi-automatic collection system (Equittec[®], Marau, Brazil) within a pre-warmed (38°C) collection cup with filter to remove the gel fraction. Raw semen was weighed and evaluated for motility and sperm concentration using a computer-assisted semen analyzer (CASA system; AndroVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Only normospermic ejaculates were used for the study, following the criteria of at least 70% total sperm motility and a minimum of 75% morphologically normal spermatozoa.

Semen was diluted in a split sample design in Androstar[®] Plus (AND, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and Beltsville Thawing Solution (BTS, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) (Supplemental Table 1) using isothermic dilution (34°C). Insemination doses were produced with 1.5×10^9 spermatozoa and filled in 60 mL tubes (QuickTip Flexitube[®] Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) with volume of 55 mL. Extended semen doses were placed in ventilated air-conditioned boxes at 22°C for temperature stabilization during three hours and transported to the laboratory for storage and further analysis. Semen doses were analyzed immediately after the arrival at the laboratory, defined as time 0.

Semen doses were assigned in a split sample design to the following storage groups: no-homogenization (NoHom) and twice-a-day manual dose homogenization (2xHom). Manual homogenization was performed by dose rotation at 360°. All semen doses were stored in the same temperature-controlled cabinet at 17.3±0.47°C for 168 h after the arrival at the laboratory. For each time analysis, a different sealed tube was used to avoid sperm resuspension and manipulation influence. The analyses were performed according to the timeline represented in Figure 1.

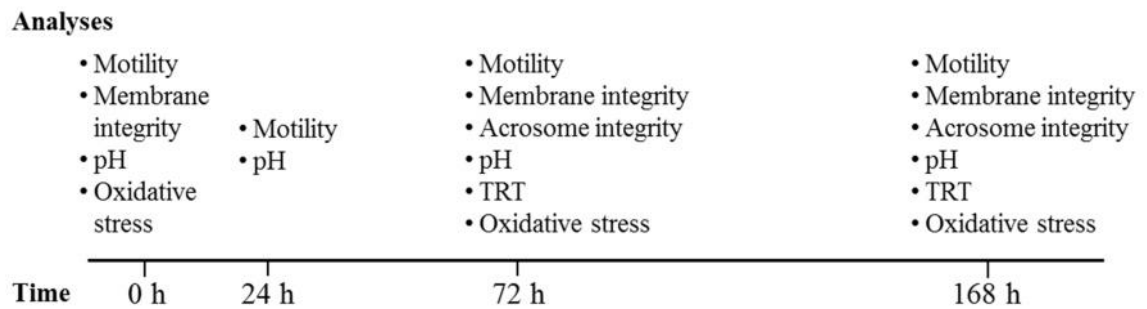


Figure 1. Timeline representing the sperm analyses performed in semen doses along storage time.

Sperm motility analysis

Sperm motion traits were assessed at 0, 24, 72, and 168 h with CASA system (AndroVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). For analysis, an aliquot of 1 mL was incubated into a thermo block for 10 min at 37°C. A sample of 3 µl was placed by capillary flow in a chamber slide (Leja[®] 20 micron chamber depth, Nieuw Venne, The Netherlands) and analyzed at 200× magnification under a phase contrast microscope (Axio Scope.A1, Zeiss[®], Germany) equipped with a warm stage set at 37°C.

CASA system provided total and progressive motility, and the following kinematic parameters: DCL - curvilinear distance (µm); DSL - straight-line distance (µm); DAP - average path distance (µm); VCL - curvilinear velocity (µm/s); VSL - straight-line velocity (µm/s); VAP - average path velocity (µm/s); ALH - amplitude of lateral head displacement (µm); BCF - beat-cross frequency (Hz); LIN - linearity (VSL/VCL); STR - straightness (VSL/VAP); and WOB - wobble (VAP/VCL). Software settings were adjusted for cell detection with a minimum head size of 15 µm and a maximum of 100 µm. Sperm with ALH < 1 µm and VCL < 24 µm/s were considered immotile. Progressive motility was defined based on VCL > 40 µm/s and VSL > 10 µm/s.

Sperm morphology and acrosome integrity analysis

Sperm morphology was assessed in samples of raw semen fixed in formalin-citrate solution (2.94%). Two hundred spermatozoa were classified according to sperm morphology in normal spermatozoa, abnormal head, acrosome defect, abnormal midpiece, attached proximal cytoplasmic droplets, attached distal cytoplasmic droplets, folded tail, and coiled tail (PURSEL et al., 1972). Evaluation was performed under phase contrast microscopy at 1000× magnification.

Acrosome integrity was assessed in semen doses during storage at 72 and 168 h. An aliquot of extended semen was fixed in formalin-citrate solution (2.94%) and two hundred spermatozoa were evaluated under phase contrast microscopy at 1000× magnification. The acrosomal region of spermatozoa was characterized according to acrosome integrity in normal or defective, the latter comprising irregular shaped, disrupted, and detached acrosomes (PURSEL et al., 1974).

Plasma membrane integrity analysis

Membrane integrity assessment was performed in diluted semen at 0, 72, and 168 h using a double-staining method with fluorescent probes SYBR-14 and propidium iodide (PI) (LIVE/DEAD[®] Sperm Viability kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were prepared in a dark room with 2.5 µl of SYBR-14/PI and 50 µl of extended semen. Samples were incubated into a thermo block for 15 min at 37°C before analysis with CASA system equipped with viability module and fluorescence microscope (Axio Scope.A1 HAL 100-FL, Filter Set 09, BP 450-490, Zeiss[®], Germany). Software settings were adjusted for cell detection with a minimum head size of 15 µm and a maximum of 100 µm. Color intensity were set for viable sperm (255 green and 0 red) and non-viable sperm (168 green and 255 red). At least 1000 spermatozoa were evaluated per sample.

Thermoresistance test (TRT)

A thermoresistance test (TRT) was performed at 72 and 168 h. An aliquot of 10 mL of semen dose was incubated in water bath (Braun Biotech[®], Allentown, PA, USA) at 38°C for up to 120 min (adapted from Schulze et al., 2013). Sperm motility was assessed at 30 min and 120 min of incubation, with CASA system as described above.

pH analysis

Measurement of pH of semen doses was performed at 0, 24, 72, and 168 h. A previously calibrated digital pH-meter (Quimis[®] Q400AS, São Paulo, Brazil) was used for the assessment and the pH electrode was washed with distilled water and wiped between samples.

Oxidative stress

Sample preparation

Sperm samples from extended semen were prepared for oxidative stress analysis, which was performed at 0, 72, and 168 h of storage. Samples from 8 boars were used for analysis of lipid peroxidation, protein oxidation, sulfhydryl content, total radical-trapping antioxidant potential, and superoxide dismutase activity, and samples from 14 boars were used for intracellular reactive species assay. Semen doses (14 mL) were centrifuged for 10 min at $2000 \times g$ to form a sperm pellet. Extender was removed and the pellet was washed with 10 mL of saline (NaCl 0.9%). This procedure was repeated three times in order to form an appropriate pellet and to avoid interference of extender compounds in the analysis. The pellet was resuspended in 1 mL of PBS at 50 mM (pH 7.2), vortexed, and then frozen at -20°C until analysis. The final concentration in the samples was approximately 380×10^6 spermatozoa per mL.

Samples were thawed at room temperature and then sonicated on ice for a minimum of 2×10 sec at 60% power (Sonicator[®] XL2020, Misonix Inc., USA) and homogenized with an automatic homogenizer (LabGEN[®] 125, Cole-Parmer[®], USA). An aliquot of 250 μl of sample was separated for lipid peroxidation and protein oxidation assays. The remaining sample was centrifuged for 10 min at $6000 \times g$ to form a pellet and obtain a clear supernatant, which was used for sulfhydryl content, total radical-trapping antioxidant potential, and superoxide dismutase activity assays.

For intracellular reactive species assay, spermatozoa must remain viable and intact in order to measure intracellular reactive species. Thereby, samples were analyzed without previous sonication, homogenization, or freezing. One milliliter of semen dose was centrifuged for 2 min at $1500 \times g$ at room temperature and pellet was washed with a solution formulated to contain 205.37 mM glucose, 20.4 mM sodium citrate, 3.36 mM EDTA, and 10.01 mM potassium chloride. After a re-centrifugation for 2 min at $1500 \times g$, pellet was resuspended with this solution added with DCFH-DA at 100 μM .

Sperm lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by thiobarbituric acid method (TBA). The assay measures the malondialdehyde (MDA) content, an end-product of lipid peroxidation. After samples had been plated, absorbance was measured in microplate reader (Spectramax[®] i3, Molecular Devices, USA) at 532 nm wavelength (DRAPER & HADLEY, 1990; CRUZ et al., 2015).

Sperm protein oxidation

Protein oxidative damage was measured by carbonyl groups content. The method is based on the reaction of carbonyl with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and absorbance measurement in microplate reader at 370 nm wavelength (LEVINE et al., 1990; MAJI BALI et al., 2012).

Cell oxidative stress assay

Intracellular reactive species was measured using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) method. DCFH-DA crosses cell membranes and is hydrolyzed enzymatically by intracellular esterases to nonfluorescent dichlorofluorescein (DCFH). In the presence of reactive oxygen species, DCFH is oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF). The emitted fluorescence was measured in a fluorescent microplate reader (Spectramax[®] i3, Molecular Devices, USA) at excitation/emission of 485/532 nm for 1 h (WANG & JOSEPH, 1999; KHOSRAVI et al., 2014).

Sulfhydryl content assay

The oxidative status of thiol groups was assessed by quantification of total reduced -SH groups. The method is based on the reaction of sulfhydryl with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and absorbance measurement in microplate reader at 412 nm wavelength (ELLMAN, 1959; CRUZ et al., 2015).

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP)

Non-enzymatic antioxidant capacity was assessed by total radical-trapping antioxidant potential (TRAP). The method consists in measuring the intensity of luminol chemiluminescence induced by free radicals derived from 2,2-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP), a known source of constant production rate of free radicals. Trolox, which is a water-soluble vitamin E analogue, was used as an antioxidant reference. Light intensity was measured in a microplate scintillator (1450 MicroBeta[®] Trilux, Perkin Elmer[®], Finland) (WAYNER et al., 1985; LISSI et al., 1995; RHEMREV et al., 2001).

Superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity was measured by its capacity to inhibit the epinephrine autoxidation. During epinephrine autoxidation, the reaction elicits the formation of reactive oxygen species, especially superoxide anion (O_2^-), which contribute to oxidation of epinephrine to adrenochrome. The adrenochrome formation was measured in microplate reader at 480 nm wavelength (MISRA & FRIDOVICH, 1972; MACANOVIC et al., 2015).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the Statistical Analysis System software (SAS, version 9.3; SAS[®] Institute Inc., Cary, NC, USA). All variables derived from sperm motility traits, membrane and acrosome integrity, pH, and oxidative stress were analyzed as repeated measures using the GLIMMIX procedure. Values derived from measurements at 0 h were included in the analysis as covariates when significant ($P < 0.05$). Homogenization, extender, storage time, and their interactions were included in the model as fixed effects. Boar and plate (for oxidative stress assays only) were included as random effects. Values are presented as LSMeans \pm Standard Error of Mean. Homogenization groups, extenders, and storage times were compared using the Tukey-Kramer test at a significance level of 5%.

Results

Overall, percentages of total motility, progressive motility, and morphologically normal spermatozoa in raw semen were 94.4 ± 0.5 , 91.1 ± 0.7 , and 94.3 ± 1.5 , respectively. Mean values of total motility, progressive motility, and membrane integrity assessed on semen doses extended in AND and BTS at 0 h were $88.3 \pm 0.9\%$, $82.1 \pm 1.2\%$, and $88.9 \pm 0.8\%$, respectively.

Motility and kinematic parameters

Homogenization of stored semen doses had no influence on total and progressive motility ($P > 0.05$) during storage. The percentage of motile spermatozoa was similar between extenders at 24 h and 72 h ($P < 0.05$), but at 168 h AND was superior to BTS (interaction between extender and storage time; $P = 0.0040$). For both extenders, total and progressive motility (Figure 1) declined during storage ($P < 0.0001$).

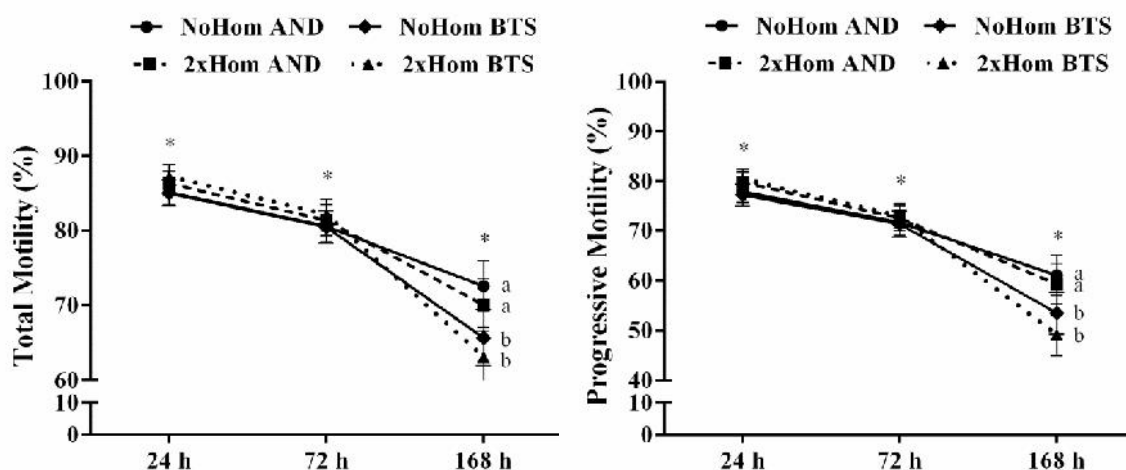


Figure 2. Total and progressive sperm motility according to homogenization, extender, and storage time.

* indicate significant difference between storage time for both extenders ($P < 0.0001$).

a,b indicate significant difference ($P = 0.0040$) between extenders at 168 h.

NoHom=no-homogenization; 2xHom=twice-a-day manual homogenization;

AND=Androstar[®] Plus extender; BTS=Beltsville Thawing Solution extender.

All sperm kinematic parameters assessed with CASA system during storage were not affected ($P > 0.05$) by homogenization (Supplemental Table 2). For DCL, DSL, DAP, VCL, VSL, VAP, and BCF, semen extended in AND presented higher values compared to BTS ($P < 0.05$) and those parameters decreased significantly during storage time for both extenders ($P < 0.0001$). The parameters STR, LIN and WOB were similar between extenders, except at 24 h (interaction between extender and storage time, $P < 0.001$). The ALH values were affected neither by homogenization nor by extender at 72 h ($P > 0.05$), but at 24 h and 168 h there was an effect of the interaction between homogenization and storage time ($P = 0.0006$) and between extender and storage time ($P = 0.0204$).

Thermoresistance test (TRT)

After 30 min TRT, sperm motility, progressive motility, and kinematic parameters DCL, DSL, DAP, VCL, VSL, VAP, BCF, and ALH were significantly influenced ($P < 0.05$) by homogenization and storage time (Table 1). After 120 min TRT, the effect of storage time was also observed for the above mentioned motion parameters, but homogenization exerted influence ($P < 0.05$) only on DCL, VCL, VAP, and ALH (Table 1). When the effect of homogenization was evidenced, higher values ($P < 0.05$) were observed for NoHom semen doses compared to 2xHom doses, on both

TRT time. The kinematic parameter STR was affected by storage time on both TRT time, while LIN was influenced by storage time only on 120 min TRT, and WOB was neither affected by homogenization nor storage time.

Sperm motility, progressive motility, and kinematic parameters DCL, DSL, DAP, VCL, VSL, VAP, BCF, and ALH were significantly influenced ($P < 0.0001$) by extender after TRT for 30 min and 120 min, regardless of homogenization and storage time (Table 2). Higher values ($P < 0.0001$) were found for doses diluted in AND extender compared to BTS extender. After 30 min TRT, STR ($81.8 \pm 1.0\%$ vs. $77.8 \pm 1.0\%$; $P < 0.0001$), LIN ($48.2 \pm 1.2\%$ vs. $42.8 \pm 1.2\%$; $P < 0.0001$), and WOB ($55.1 \pm 1.1\%$ vs. $50.4 \pm 1.1\%$; $P < 0.0001$) were higher in AND compared to BTS, respectively. After 120 min TRT, STR, LIN, and WOB decreased during storage, but only in BTS extender ($81.2 \pm 0.9\%$ vs. $78.5 \pm 0.9\%$, $46.8 \pm 1.1\%$ vs. $44.3 \pm 1.2\%$, and $53.8 \pm 1.0\%$ vs. $52.1 \pm 1.1\%$, for 72 h and 168 h respectively; interaction between extender and storage time; $P < 0.05$).

Table 1. Spermatic motion parameters after thermoresistance test (TRT) at 38°C for 30 min or 120 min according to homogenization of semen doses during storage (n=21).

Sperm motion parameter	TRT 30 min				Effect (P<0.05)	TRT 120 min				Effect (P<0.05)
	72 h		168 h			72 h		168 h		
	NoHom	2xHom	NoHom	2xHom		NoHom	2xHom	NoHom	2xHom	
Total motility, %	80.8±1.8	77.2±2.0	81.3±1.7	69.7±2.9	H, T	74.8±2.4	67.0±2.8	82.4±1.6	75.1±2.6	T
Progressive motility, %	71.8±2.4	68.4±2.5	67.0±3.2	60.1±3.5	H, T	66.5±3.2	56.3±3.5	75.0±2.1	74.0±2.2	T
DCL, µm	26.4±1.0	24.1±1.0	28.6±1.4	26.0±1.4	H, T	24.9±1.0	21.9±1.0	32.2±1.2	30.3±1.2	H, T
DSL, µm	12.8±0.6	11.9±0.6	14.9±0.8	13.5±0.8	H, T	12.0±0.6	10.4±0.6	16.6±0.8	15.9±0.8	T
DAP, µm	14.4±0.6	13.4±0.6	16.6±0.8	15.0±0.8	H, T	13.7±0.6	11.9±0.6	18.4±0.8	17.6±0.8	T
VCL, µm/s	60.9±2.5	55.6±2.5	67.6±3.4	60.3±3.4	H, T	57.9±2.5	50.4±2.5	75.1±3.1	70.9±3.1	H, T
VSL, µm/s	29.7±1.5	27.6±1.5	35.3±2.1	31.5±2.1	H, T	28.2±1.5	24.1±1.6	38.8±1.9	37.5±1.9	T
VAP, µm/s	33.5±1.5	31.0±1.5	39.4±2.2	35.0±2.2	H, T	31.9±1.5	27.5±1.5	43.1±2.1	41.4±2.1	H, T
BCF, Hz	16.5±0.7	15.4±0.7	17.0±1.0	15.5±1.0	H, T	15.1±0.7	13.1±0.7	19.5±0.9	19.0±0.9	T
ALH, µm	0.62±0.02	0.58±0.02	0.65±0.02	0.6±0.02	H, T	0.61±0.02	0.56±0.02	0.69±0.02	0.66±0.02	H, T
STR, %	80.2±1.0	80.5±1.0	80.7±0.9	80.0±0.9	T	79.9±1.0	78.6±1.0	81.6±0.9	82.5±0.9	T
LIN, %	45.6±1.3	46.3±1.3	47.7±1.2	47.2±1.2	-	45.6±1.3	44.5±1.3	47.9±1.1	49.2±1.1	T
WOB, %	52.6±1.1	53.3±1.1	55.0±1.1	54.6±1.1	-	53.0±1.1	52.1±1.1	54.7±1.0	55.9±1.0	-

Values expressed as LSMeans ± Standard Error of Mean, regardless of extender. H=significant effect of homogenization; T= significant effect of time of storage; -=no significant effect of homogenization or time of storage.

NoHom=no-homogenization; 2xHom=twice-a-day manual homogenization.

DCL=curvilinear distance; DSL=straight-line distance; DAP=average path distance; VCL=curvilinear velocity; VSL=straight-line velocity; VAP=average path velocity; BCF=beat-cross frequency; ALH=amplitude of lateral head displacement; STR=straightness (VSL/VAP); LIN=linearity (VSL/VCL); WOB=wobble (VAP/VCL).

Table 2. Spermatic motion parameters after thermoresistance test (TRT) at 38°C for 30 min or 120 min according to extender (n=21).

Sperm motion parameter	TRT 30 min		TRT 120 min	
	AND	BTS	AND	BTS
Total motility, %	82.3±1.7 ^a	66.5±2.5 ^b	82.7±1.7 ^a	71.3±2.4 ^b
Progressive motility, %	75.4±2.2 ^a	55.1±3.0 ^b	75.9±2.3 ^a	61.8±2.9 ^b
DCL, µm	28.3±0.9 ^a	20.3±0.9 ^b	32.2±1.3 ^a	26.4±1.3 ^b
DSL, µm	14.0±0.6 ^a	9.5±0.6 ^b	17.1±0.8 ^a	13.3±0.8 ^b
DAP, µm	15.9±0.6 ^a	10.8±0.6 ^b	19.0±0.8 ^a	14.9±0.8 ^b
VCL, µm/s	66.2±2.3 ^a	46.3±2.3 ^b	75.8±3.1 ^a	61.1±3.1 ^b
VSL, µm/s	32.9±1.5 ^a	21.9±1.4 ^b	40.4±1.9 ^a	31.2±1.9 ^b
VAP, µm/s	37.2±1.4 ^a	24.7±1.4 ^b	44.8±2.0 ^a	34.7±2.0 ^b
BCF, Hz	17.8±0.7 ^a	12.3±0.7 ^b	19.8±0.9 ^a	15.7±0.9 ^b
ALH, µm	0.67±0.02 ^a	0.52±0.02 ^b	0.71±0.02 ^a	0.59±0.02 ^b

Values expressed as LSMeans ± Standard Error of Mean, regardless of homogenization and storage time. a,b indicate significant (P<0.0001) difference between extender within each TRT time.

AND=Androstar[®] Plus extender; BTS=Beltsville Thawing Solution extender.

DCL=curvilinear distance; DSL=straight-line distance; DAP=average path distance; VCL=curvilinear velocity; VSL=straight-line velocity; VAP=average path velocity; BCF=beat-cross frequency; ALH=amplitude of lateral head displacement.

Membrane and acrosome integrity

Sperm membrane and acrosome integrity were not influenced (P>0.05) by semen dose homogenization (85.1±1.8% vs. 83.9±1.9% and 97.3±0.2% vs. 97.1±0.2% for NoHom vs. 2xHom, respectively). The percentage of membrane integrity was higher in doses extended in AND compared to BTS (86.1±1.7% vs. 82.8±2.0%; P<0.0001) and declined along the storage time (89.5±1.4% at 72 h vs. 77.8±2.6% at 168 h; P<0.0001). Likewise, the proportion of normal acrosome was higher for AND compared to BTS (98.1±0.2% vs. 95.9±0.3%; P<0.0001), but remained unaltered during storage (97.4±0.2% at 72 h vs. 97.1±0.3% at 168 h; P>0.05).

pH

The pH values of semen doses varied significantly according to homogenization, extender, and storage time (P<0.05). pH was slightly increased in 2xHom doses compared to NoHom ones (7.57±0.01 vs. 7.55±0.01; P=0.05), in BTS compared to AND (7.59±0.01 vs. 7.54±0.01; P=0.0004), and as storage time increased (7.40±0.01 at 24 h, 7.54±0.01 at 72 h, and 7.74±0.01 at 168 h; P<0.0001).

Oxidative status

Results from oxidative stress assays are expressed in Figure 3 for TBA, carbonyl, DCF, and sulfhydryl, and in Figure 4 for TRAP and SOD. For TBA assay, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content in semen doses was affected by extender ($P < 0.0001$), with BTS presenting higher quantification of TBARS per billion sperm cells compared to AND. Carbonyl content was also affected by extender ($P = 0.0046$), and higher levels of carbonyl per billion sperm cells were observed in AND than in BTS. Quantification of DCF was influenced by storage time ($P = 0.0385$), with increased relative fluorescent units (RFU) at the end of the storage period. Quantification of sulfhydryl groups (-SH) in semen doses revealed an interaction between extender and storage time ($P = 0.0338$), in which the extender AND was able to maintain SH content during storage and BTS presented a significantly decrease in SH content along storage time.

TRAP was affected by extender ($P < 0.0001$) and storage time ($P = 0.03$), wherein the area under curve (AUC) was larger for BTS and storage time of 168 h compared to AND and storage time of 72 h, respectively. The AUC is inversely proportional to the antioxidant potential of samples. SOD activity was influenced by extender ($P = 0.0028$), with higher enzyme activity being observed in AND than in BTS. An interaction between homogenization and storage time has also influenced SOD activity ($P = 0.0287$), in which the 2xHom semen doses presented a constant enzyme activity during storage while NoHom semen doses had an increased SOD activity at the end of the storage period.

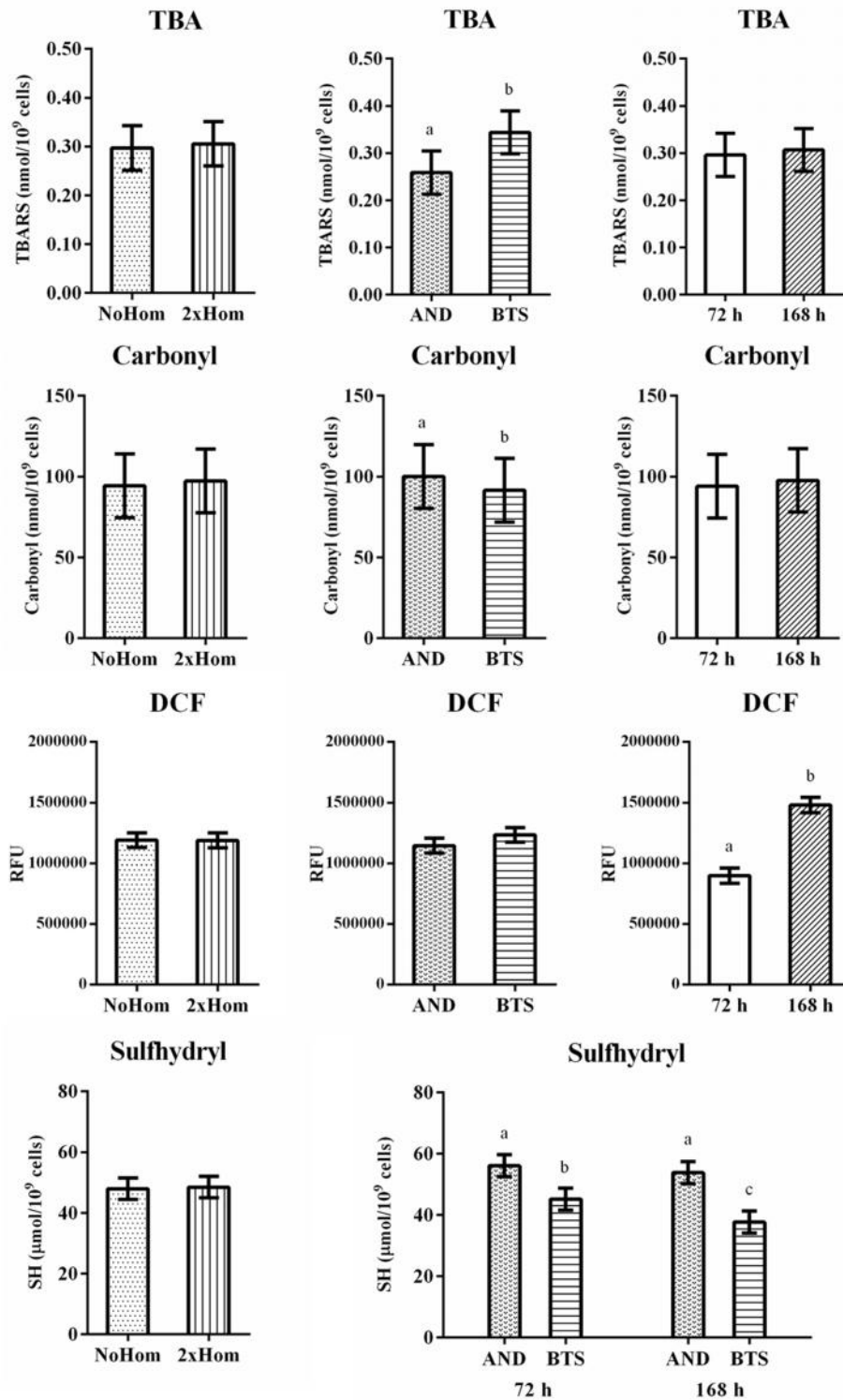


Figure 3. Effect of homogenization, extender, storage time, and interactions on oxidative stress assays in semen doses: thiobarbituric acid (TBA), carbonyl, dichlorofluorescein (DCF), and sulphydryl (SH).

a,b indicate significant difference ($P < 0.05$) between extender or storage time.

NoHom=no-homogenization; 2xHom=twice-a-day manual homogenization;

AND=Androstar[®] Plus extender; BTS=Beltsville Thawing Solution extender;

TBARS=thiobarbituric acid reactive substances; RFU= relative fluorescent units.

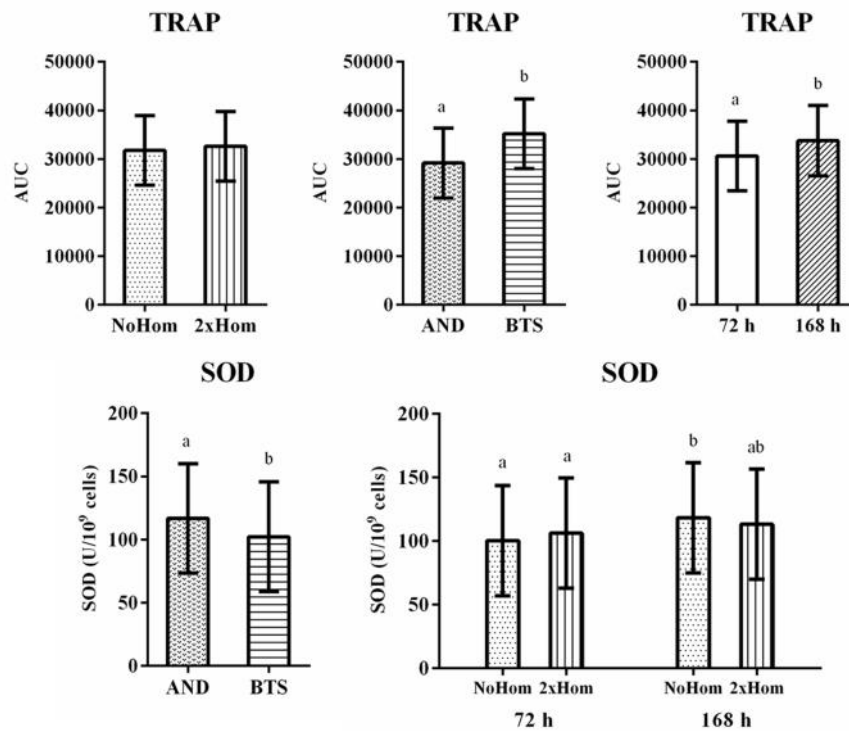


Figure 4. Effect of homogenization, extender, storage time, and interactions on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and superoxide dismutase (SOD) activity in semen doses.

a,b,c indicate significant difference ($P < 0.05$) between extenders or between storage time within extenders or within homogenization.

NoHom=no-homogenization; 2xHom=twice-a-day manual homogenization;

AND=Androstar[®] Plus extender; BTS=Beltsville Thawing Solution extender;

AUC= area under curve (inversely proportional to the antioxidant potential of samples).

Discussion

The current tendency for the efficient use of boar ejaculates requires strict quality standards during semen processing and storage (RIESENBECK et al., 2015). The study about homogenization of liquid-stored boar semen is relevant from a practical point of view because it is a procedure widely applied in a daily basis during storage of semen doses. Indeed, semen storage units with automatic homogenization systems are currently available. In a scientific context, the effect of homogenization on semen quality is divergent among studies and its underlying mechanism remains unclear (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995; SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015b). The results obtained in the present study established that no-homogenization or twice-a-day manual homogenization of semen doses does not affect spermatic parameters and oxidative status during long storage period. Moreover, the considerations are applied for both short- and long-term extenders compared here.

No-homogenization or homogenization of liquid-stored semen doses resulted in similar percentages of total and progressive motile spermatozoa, as well as sperm kinematic parameters assessed with CASA system during 168 h of storage. Discrepancies exist among studies about the effect of homogenization of semen doses during storage on sperm motility. While some authors did not report significant difference between no-rotation and manual rotation of semen doses on sperm motility (SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015b), others found that slight agitation of diluted semen along storage improved progressive motility (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995). On the other hand, the divergences found among studies can be partially attributed to the subjectivity of microscopically assessed sperm motility (BROEKHUIJSE et al., 2011). Our study was performed with CASA system, which supported standardized evaluations and allow us to enhance our sperm motion analysis with kinematic parameters.

Thermoresistance test was performed to measure the ability of spermatozoa to survive and maintain their functional competence under simulated conditions of the sow's physiological body temperature (TARDIF et al., 1999). In our study, samples were incubated at 38°C for 30 min and 120 min and then evaluated for motility parameters. After 30 min TRT, the percentages of total motility, progressive motility, and kinematic parameters (DCL, DSL, DAP, VCL, VSL, VAP, BCF, ALH) were found to be significantly superior in non-homogenized semen doses compared to the homogenized ones. Other study had previously noticed the importance of TRT in discriminating the effects of rotation during semen doses storage on the maintenance of sperm motility (SCHULZE et al., 2015b). The thermal test could have revealed the subtle levels of latent damage related to the homogenization process, which were undetectable by routine motility evaluation (FISER et al., 1991). Although the effect of homogenization was previously evidenced after 300 min of TRT (SCHULZE et al., 2015b), higher motility and kinematic parameters in non-homogenized semen doses than in the homogenized ones were already evidenced after 30 min of TRT at 38°C in the present study, indicating a discriminatory effect by using this incubation time.

Sperm viability, expressed as a measure of sperm membrane integrity assessed by double-staining with SYBR-14/PI, was not affected by homogenization of extended semen during storage, as previously reported for non-returned and manually turned semen doses (SCHULZE et al., 2015b). Similarly, microscopically assessed acrosome integrity was not different between non-homogenized and homogenized semen doses, in

agreement with others (SIMMET et al., 1998). In contrast to our findings, reduced sperm viability and acrosome integrity were observed in boar semen doses stored without agitation for 92 h (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995).

A pH-rise related to the homogenization process could be explained by the increased contact of air with the extended semen, leading to a loss of CO₂ from the extender to the air compartment within the semen tube (VYT et al., 2007). However, the slight alkalization of the semen medium did not imply in lower motility preservation in twice-a-day manually homogenized doses. Indeed, previous studies have not identified the pH variation as the underlying mechanism for the prejudicial effects of homogenization to spermatozoa, since the effects persisted despite pH stabilization during storage (SCHULZE et al., 2015b).

Boar spermatozoa are especially susceptible to oxidative damage, mostly due to the high content of polyunsaturated fatty acids on the plasma membrane, which serve as a potential substrate for reactive oxygen species (ROS) formation (CEROLINI et al., 2000). Additionally, the limited cytoplasmic space within the sperm cell confers minor enzymatic protection against ROS (AITKEN et al., 2014). Oxidative activity due to excessive ROS formation during semen preservation is associated with a decline in sperm function (KUMARESAN et al., 2009). ROS were involved in disruption of plasma membrane integrity as result of lipid peroxidation on the sperm membrane (KUMARESAN et al., 2009) and impairment of sperm motility due to depletion of intracellular ATP concentration (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; GUTHRIE et al., 2008). In the present study, the percentages of membrane-intact spermatozoa and motile spermatozoa were similar in non-homogenized and twice-a-day homogenized liquid-stored semen doses, suggesting that oxidative stress was not a relevant feature in the homogenization process. Indeed, all assays performed as a measure of the oxidative status of the spermatozoa, i.e. lipid peroxidation, protein oxidation, intracellular reactive species, sulfhydryl content, and total radical-trapping antioxidant potential, were not affected by homogenization.

The enzymatic antioxidant system in mammalian spermatozoa comprises the following enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) (GADEA et al., 2004). Their enzymatic activity is directed to neutralize the harmful reactive species in semen, including superoxide (O₂⁻), hydroxyl (•OH), and hydrogen peroxide (H₂O₂) (AITKEN, 1995). Boar spermatozoa are characterized by low GPx activity and absence of CAT, which is

compensated by an increased SOD activity (ORZOŁEK et al., 2013). During semen preservation, a decline in enzymatic activity of SOD was associated with enhanced lipid peroxidation in human cryopreserved spermatozoa (ALVAREZ & STOREY, 1992). The significant increase of SOD activity in non-homogenized semen doses during storage contrasted with a constant enzymatic activity in homogenized doses throughout the storage period. Although the unaltered SOD activity was not sufficient to increase oxidative damage in the homogenized semen doses, it can be speculated that the antioxidant defense was weakened in doses that remain with the same enzymatic activity along storage time (ALVAREZ & STOREY, 1992).

Our results clearly report an extender effect on spermatic parameters and oxidative status in favor to AND compared to BTS. The percentage of total and progressive motility was similar between extenders until the claimed preservation period of BTS (72 h). After that (168 h), motility was higher in seminal doses diluted in AND, as expected. Several researchers agreed that long-term and short-term extenders display an equal ability to preserve sperm motility in short storage periods (DE AMBROGI et al., 2006; ESTIENNE et al., 2007), and that semen dilution in long-term extenders is mandatory for sperm quality maintenance in prolonged preservation periods (DUBÉ et al., 2004; VYT et al., 2004; WATERHOUSE et al., 2004). The superiority of AND compared to BTS for the sperm kinematics DCL, DSL, DAP, VCL, VSL, VAP, and BCF, throughout the storage, is in agreement with the reported higher kinematic values in semen doses stored in long-term extenders (PINART et al., 2015), but contradict the results of another study (DE AMBROGI et al., 2006). Indeed, our results became notably evident after performing a thermal test at 38°C for 30 min and 120 min of incubation. A pH variation of the extended medium could explain the extender effect on sperm motility and kinematics (VYT et al., 2004). However, although significant, only a slight difference in pH was found between extenders in our study.

The distinction found among extenders for motility parameters was accompanied by differences in plasma membrane and acrosome integrity. In accordance to our results, long-term extenders seemed to preserve the integrity of plasma and acrosome membrane better than short-term extenders (WATERHOUSE et al., 2004). This superiority can be attributed to the oxidative status of the extended semen and its role on membrane stability (AITKEN, 1995). Indeed, membrane lipid peroxidation has been associated with impaired membrane viability and acrosome integrity in boar semen

(CEROLINI et al., 2000; WATERHOUSE et al., 2004; AWDA et al., 2009). In the present study, semen doses extended in BTS presented higher TBARS content, indicating an increased lipid peroxidation in spermatozoa stored in the short-term extender. Moreover, the oxidative damage was enhanced in BTS as result of the lower total antioxidant potential, SOD activity, and sulfhydryl content. Contrary to expectations, carbonyl content in semen doses indicated higher protein oxidative damage in AND extended semen.

Despite an evident influence of extender on spermatic and oxidative stress parameters, the process of no-homogenization or twice-a-day manual homogenization of liquid-stored semen doses had the same outcome on sperm quality for both AND and BTS extenders. It can be inferred that, regardless of the extender composition and its efficiency on sperm preservation during storage, the effects of homogenization were not minimized when semen was diluted in long-term extenders.

Conclusion

Sperm motility parameters, plasma membrane and acrosome integrity, and oxidative status assessed by lipid peroxidation, protein oxidation, sulfhydryl content, intracellular reactive species, and total radical-trapping antioxidant potential were not affected by homogenization. No-homogenization of liquid-stored semen was superior in terms of preserving the sperm motility after thermoresistance test, the pH of semen doses, and the antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase during storage. Twice-a-day manual homogenization is not necessary for normospermic boar semen doses stored for 168 h in Androstar[®] Plus or BTS extender.

Supplemental Table 1. Composition of the extenders used for dilution of boar semen as informed by the supplier.

Ingredient (g/l)	Androstar [®] Plus	Beltsville Thawing Solution
Glucose	79.36	76.06
Sodium citrate	12.38	15.89
EDTA	3.05	2.65
Sodium bicarbonate	2.66	3.31
Potassium chloride	1.60	1.59
Gentamicin sulphate	0.53	0.50
Cysteine	0.42	-

EDTA=ethylenediamine tetraacetic acid

Supplemental Table 2. Effect of homogenization, extender, storage time, and their interaction on sperm kinematic parameters.

Storage time	24 h				72 h				168 h				Effect (P<0.05)
Extender	AND		BTS		AND		BTS		AND		BTS		
Group	NoHom	2xHom	NoHom	2xHom	NoHom	2xHom	NoHom	2xHom	NoHom	2xHom	NoHom	2xHom	
DCL, μm	43.8 \pm 1.8	46.5 \pm 1.8	42.8 \pm 1.8	45.4 \pm 1.8	39.8 \pm 1.8	40.8 \pm 1.8	38.9 \pm 1.8	38.3 \pm 1.8	34.4 \pm 2.1	32.7 \pm 2.1	30.0 \pm 2.1	27.2 \pm 2.1	E, T
DSL, μm	15.4 \pm 0.7	16.0 \pm 0.7	13.5 \pm 0.7	14.1 \pm 0.7	12.4 \pm 0.7	13.0 \pm 0.7	11.7 \pm 0.7	11.5 \pm 0.7	10.0 \pm 0.7	10.0 \pm 0.7	8.6 \pm 0.7	8.0 \pm 0.7	E, T
DAP, μm	19.9 \pm 0.8	20.9 \pm 0.8	18.4 \pm 0.8	19.4 \pm 0.8	16.9 \pm 0.8	17.46 \pm 0.8	16.4 \pm 0.8	16.0 \pm 0.8	14.1 \pm 0.9	13.6 \pm 0.9	12.2 \pm 0.9	11.0 \pm 0.9	E, T
VCL, $\mu\text{m/s}$	104.8 \pm 4.6	111.8 \pm 4.6	102.5 \pm 4.6	109.3 \pm 4.6	95.1 \pm 4.7	97.5 \pm 4.7	92.4 \pm 4.7	91.2 \pm 4.7	82.0 \pm 5.3	77.7 \pm 5.3	71.2 \pm 5.3	64.2 \pm 5.3	E, T
VSL, $\mu\text{m/s}$	37.4 \pm 1.8	39.0 \pm 1.8	32.8 \pm 1.8	34.6 \pm 1.8	30.1 \pm 1.8	31.6 \pm 1.8	28.3 \pm 1.8	27.8 \pm 1.8	24.5 \pm 1.9	24.1 \pm 1.9	21.0 \pm 1.9	19.1 \pm 1.9	E, T
VAP, $\mu\text{m/s}$	47.8 \pm 2.2	50.5 \pm 2.2	44.2 \pm 2.2	47.0 \pm 2.2	40.6 \pm 2.1	41.9 \pm 2.1	39.2 \pm 2.1	38.2 \pm 2.1	33.9 \pm 2.4	32.5 \pm 2.4	29.3 \pm 2.4	26.25 \pm 2.4	E, T
BCF, Hz	18.3 \pm 0.7	18.9 \pm 0.7	16.5 \pm 0.7	17.2 \pm 0.7	15.2 \pm 0.7	15.6 \pm 0.7	14.0 \pm 0.7	14.2 \pm 0.7	12.9 \pm 0.8	12.8 \pm 0.8	10.7 \pm 0.8	10.4 \pm 0.8	E, T
ALH, μm	1.2 \pm 0.04	1.2 \pm 0.04	1.2 \pm 0.04	1.3 \pm 0.04	1.1 \pm 0.04	1.1 \pm 0.04	1.1 \pm 0.04	1.1 \pm 0.04	1.0 \pm 0.05	0.9 \pm 0.05	0.9 \pm 0.05	0.8 \pm 0.05	E*T, H*T
STR, %	72.6 \pm 0.7	72.2 \pm 0.7	70.3 \pm 0.7	70.4 \pm 0.7	68.7 \pm 0.7	69.5 \pm 0.7	68.5 \pm 0.7	69.3 \pm 0.7	66.0 \pm 0.9	67.7 \pm 0.9	66.1 \pm 0.9	66.3 \pm 0.9	E*T
LIN, %	34.0 \pm 0.6	33.5 \pm 0.6	31.5 \pm 0.6	31.7 \pm 0.6	30.3 \pm 0.5	31.1 \pm 0.5	30.9 \pm 0.5	30.9 \pm 0.5	28.5 \pm 0.7	30.1 \pm 0.7	29.3 \pm 0.7	29.1 \pm 0.7	E*T
WOB, %	44.6 \pm 0.4	44.1 \pm 0.4	42.7 \pm 0.4	42.9 \pm 0.4	41.9 \pm 0.4	42.4 \pm 0.4	42.7 \pm 0.4	42.2 \pm 0.4	40.5 \pm 0.5	41.5 \pm 0.5	41.4 \pm 0.5	40.6 \pm 0.5	E*T

Values expressed as LSMeans \pm Standard Error of Mean.

NoHom=no-homogenization; 2xHom=twice-a-day manual homogenization; AND=Androstar[®] Plus extender; BTS=Beltsville Thawing Solution extender. E=extender; T=time of storage; E*T=interaction between extender and time of storage; H*T=interaction between homogenization and time of storage. DCL=curvilinear distance; DSL=straight-line distance; DAP=average path distance; VCL=curvilinear velocity; VSL=straight-line velocity; VAP=average path velocity; BCF=beat-cross frequency; ALH=amplitude of lateral head displacement; STR=straightness (VSL/VAP); LIN= linearity (VSL/VCL); WOB=wobble (VAP/VCL).

Conflict of interest

None of the authors declare any conflict of interest.

Acknowledgment

The authors are grateful to Dália Alimentos and their semen processing unit for providing the semen doses used in this study, to Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul for their partnership, and to CNPq for financial support.

References

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659–668, 1995.
- AITKEN, R.J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of sperm physiology – Oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 17–27, 2014.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Anthology**, v. 13, p. 232-241, 1992.
- AUSEJO, R.; DAHMANI, Y.; MENDOZA, N.; YEREGUI J. Effect of an air chamber in stored boar seminal doses. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 124(P20), 2015.
- AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M.M. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 553–561, 2009.
- BELSTRA, B. On-farm semen receiving, storage and use for a successful AI program. **Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar**. Clinton, North Carolina, USA. 2007, 9 p.
- BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, p. 1473–1486, 2011.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.
- CRUZ, D.F.; LUME, C.; SILVA, J.V.; NUNES, A.; CASTRO, I.; SILVA, R.; SILVA, V.; FERREIRA, R.; FARDILHA, M. Oxidative stress markers: can they be used to evaluate human sperm quality? **Turkish Journal of Urology**, v. 41, n. 4, p. 198–207, 2015.
- DE AMBROGI, M.; BALLESTER, J.; SARAIVIA, F.; CABALLERO, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-

MARTINEZ, H. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 543–552, 2006.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II: Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379–386, 1992.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

DUBÉ, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C.; BAILEY, J.L. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, v. 62, p. 874–886, 2004.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

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

FISER, P.S.; HANSEN, C.; UNDERHILL, L.; MARCUS, G.J. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 28, p. 454–459, 1991.

GADEA, J. Review: Semen extenders used in artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 17–27, 2003.

GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A.; MATÁS, P.C.C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation – Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62, p. 690–701, 2004.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R.; LONG, J.A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology**, v. 70, p. 1209–1215, 2008.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.

KHOSRAVI, F.; VALOJERDI, M.R.; AMANLOU, M.; KARIMIAN, L.; ABOLHASSANI, F. Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm dna fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. **Andrologia**, v. 46, n. 1, p. 17–23, 2014.

KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K.M.; BARDOLOI, R.K.; DAS, A.; KUMAR, S.; NASKAR, S. Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 162–171, 2009.

LEAHY, T.; GADELLA, B.M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46(Suppl. 2), p. 7–13, 2011.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI A.; CLIMENT, I., LENZ, A. G.; AHN, B.W.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods of Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of Total antioxidant potential (TRAP) and Total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 1995.

MACANOVIC, B.; VUCETIC, M.; JANKOVIC, A.; STANCIC, A.; BUZADZIC, B.; GARALEJIC, E.; KORAC, A.; KORAC, B.; OTASEVIC, V. Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: A pilot study. **Disease Markers**, p. 1–5, 2015.

MAJI BALI, I.; MILINKOVIĆ-TUR, S.; SAMARDŽIJA, M.; VINCE, S. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 423–31, 2012.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

ORZOLEK, A.; WYSOCKI, P.; STRZEZEK, J.; KORDAN, W. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16°C) in different extenders. **Reproductive Biology**, v. 13, p. 34–40, 2013.

PINART, E.; YESTE, M.; PRIETO-MARTÍNEZ, N.; REIXACH, J.; BONET, S. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter? **Theriogenology**, v. 83, p. 1428–1437, 2015.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v. 34, p. 278-283, 1972.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Acrosome morphology of boar spermatozoa during *in vitro* aging. **Journal of Animal Science**, v. 38, p. 113-116, 1974.

RHEMREV, P.T.J.; MENKVELD, R.; ROSEBOOM, T.J.; VAN OVERVELD, F.W.P.C.; TEERLINK, T.; LOMBARD, C.; VERMEIDEN, J. P.W. The acrosome index, radical buffer capacity and number of isolated progressively motile spermatozoa predict IVF results. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1885–1892, 2001.

RIESENBECK, A. Review on international trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46(Suppl. 2), p. 1–3, 2011.

RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; HENNING, H.; WABERSKI, D. Quality control of boar sperm processing: Implications from European AI centres and two spermatology reference laboratories. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 1–4, 2015.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 141–146, 1995.

SCHULZE, M.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; SCHMOLL, F.; GROSSFELD, R.; GRIESSLER, A. Effects on boar semen quality after infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus: A case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, p. 16–24, 2013.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; JUNG, M.; GROSSFELD, R. Use of refractometry as a new management tool in AI boar centers for quality assurance of extender preparations. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 77–82, 2015a.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 684–87, 2015b.

SIMMET, C.; RATH, D.; LORTON, S. Dose sedimentation of liquid boar semen influence semen quality during storage? **Proceedings of the 15th IPVS Congress**. Birmingham, England. v. 3, p. 62, 1998.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.-P.; CORMIER, N.; BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, p. 447-459, 1999.

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

VYT, P.; MAES, D.; SYS, S.U.; RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A. Air contact influences the pH of extended porcine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 218–220, 2007.

WANG H.; JOSEPH, J.A. Quantifying oxidative stress by DCF assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 5/6, p. 612-616, 1999.

WATERHOUSE, K.E.; DE ANGELIS, P.M.; HAUGAN, T.; PAULENZ, H.; HOFMO, P.O.; FARSTAD, W. Effects of *in vitro* storage time and semen extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**, v. 62, p. 1638–1651, 2004.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS Letters**, v. 187, p. 33-37, 1985.

YOUNG, B.; DEWEY, C.; FRIENDSHIP, B. The effect of on- farm semen storage temperature on stored semen quality. **Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians**. Toronto, Ontario, Canada. p. 357- 360, 2005.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial com sêmen refrigerado está plenamente consolidada na espécie suína. A incorporação de tecnologias nas centrais de processamento de sêmen, bem como a adoção de programas de biossegurança e garantia de qualidade, visam assegurar padrões estritos de qualidade das doses inseminantes. No entanto, o armazenamento das doses de sêmen refrigeradas permanece sendo um ponto crítico na preservação da qualidade espermática.

Os espermatozoides suínos são suscetíveis a diversos fatores durante o armazenamento. Apesar de ser considerado como uma etapa importante na produção de doses de sêmen, uma vez que antecede a inseminação artificial, poucos trabalhos têm sido voltados para a avaliação de fatores que influenciam a qualidade espermática durante o armazenamento. Atualmente, a homogeneização de doses de sêmen é um procedimento amplamente adotado para assegurar a qualidade espermática ao longo do armazenamento, apesar de ter recomendações divergentes no âmbito científico.

A comparação realizada no presente estudo permitiu verificar que o armazenamento de doses de sêmen com homogeneização manual duas vezes ao dia não resulta em aprimoramento da qualidade espermática. De maneira geral, a motilidade espermática, viabilidade espermática, integridade de acrossoma e parâmetros de estresse oxidativo não se alteraram para doses armazenadas sem homogeneização ou com homogeneização manual. Além disso, as considerações podem ser aplicadas tanto para diluentes de curta duração como para aqueles de longa duração, avaliados pela diluição em BTS e Androstar[®] Plus, respectivamente.

Este estudo representa, do ponto de vista prático, a possibilidade de eliminação do procedimento diário de homogeneização de doses de sêmen suíno. Com isso, obtém-se a viabilidade de otimizar o uso da mão de obra em outras atividades que possam de fato agregar valor à qualidade da dose inseminante. Por outro lado, a manutenção da homogeneização manual das doses de sêmen duas vezes ao dia não implica necessariamente em prejuízo à qualidade espermática.

5. REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659–668, 1995.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A.; DE IULIIS, G.N.; NIXON, B. New insights into sperm physiology and pathology. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 198, p. 99–115, 2010.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, K.; BRINDLE, J. On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, p. 541-551, 1996.
- AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037–1046, 1998.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993.
- AITKEN, R.J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of sperm physiology - Oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 17–27, 2014.
- ALM, K.; PELTONIEMI, O.A.T.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 210-213, 2006.
- ALTHOUSE, G.C.; HOPKINS, S.M. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. **Theriogenology**, v. 45, p. 595-603, 1995.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317–325, 2004.
- AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 5–17, 2014.
- AM-IN, N.; KIRKWOOD, R.N.; TECHAKUMPHU, M.; TANTASUPARUK, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v. 75, p. 897–903, 2011.
- AUSEJO, R.; DAHMANI, Y.; MENDOZA, N.; YEREGUI J. Effect of an air chamber in stored boar seminal doses. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 124(P20), 2015.
- AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M. M. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 553–561, 2009.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508-515, 2001.

BELSTRA, B. On-farm semen receiving, storage and use for a successful AI program. **Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar**. Clinton, North Carolina, USA. 2007, 9 p.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BOE-HANSEN, G.B.; CHRISTENSEN, P.; VIBJERG, D.; NIELSEN, M.B.; HEDEBOE, A.M. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. **Theriogenology**, v. 69, p. 728-736, 2008.

BORTOLOZZO, F.P.; MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. New artificial insemination technologies for swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 80-84, 2015.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F.M.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L. Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. (Eds.). **Suínocultura em Ação – Inseminação Artificial na Suínocultura Tecnificada**. Porto Alegre: Palotti, 2005. p. 69-90.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, p. 707-716, 1973.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, p. 1473-1486, 2011.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 779-789, 2012a.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v. 77, p. 1466-1479, 2012b.

BROWNS, J.; SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after free-thawing. **Theriogenology**, v. 63, p. 458-469, 2005.

BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1, p. 81-93, 1990.

BUSSALEU, E.; TORNER, E. Quality improvement of boar seminal doses. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. (Eds.). **Boar Reproduction – Fundamentals and New Biotechnological Trends**. Berlin: Springer, 2013. p. 517-550.

BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v. 68(5), p. 277–283, 2005.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.

CHRISTENSEN, P.; KNUDSEN, D.B.; WACHMANN, H.; MADSEN, M.T. Quality control in boar semen production by use of the FACSCount AF system. **Theriogenology**, v. 62, p. 1218–1228, 2004.

DE AMBROGI, M.; BALLESTER, J.; SARAVIA, F.; CABALLERO, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 543–552, 2006.

DE IULIIS, G.N.; THOMSON, L.K.; MITCHELL, L.A.; FINNIE, J.M.; KOPPERS, A.J.; HEDGES, A.; NIXON, B.; AITKEN, R.J. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 517–24, 2009.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II: Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379–386, 1992.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.-C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171–183, 1990.

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

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 161–166, 1979.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432–437, 1993.

DUBÉ, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GUILLEMETTE, C.; BAILEY, J.L. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, v. 62, p. 874–886, 2004.

FAZELI, A.; HAGE, W.J.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 430-438, 1997.

FEITSMA, H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 61-71, 2009.

FISER, P.S.; HANSEN, C.; UNDERHILL, L.; MARCUS, G.J. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 28, p. 454-459, 1991.

FLOWERS, W.L. An overview of anatomy and physiology of the boar. **Proceedings of the Midwest Boar Stud Conference II**. Missouri, USA. p. 6-14, 2004b.

FLOWERS, W.L. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. **Proceedings of the Midwest Boar Stud Conference II**. Missouri, USA. p. 15-22, 2004a.

FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 52, p. 67-78, 1997.

FOLEY, C.W.; HEIDENREICH, C.J.; HARRINGTON, R.B.; JONES H.W.; ERB, R.E. Changes in fructose, lactic acid, pH, and motility of boar semen during incubation at 37°C. **Journal of Animal Science**, v. 23, p. 558-561, 1964.

FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W.T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324-1336, 2008.

GADEA, J. Review: Semen extenders used in artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 17-27, 2003.

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

GADEA, J.; MATAS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 95-108, 1998.

GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 303-308, 2004.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 276-284, 1995.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GATTI, J.; CHEVRIER, C.; PAQUINON, M.; DACHEUX, J. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 439-449, 1993.

GIL, M.C.; GARCÍA-HERREROS, M.; BARÓN, F.J.; APARICIO, I.M.; SANTOS, A.J.; GARCÍA-MARÍN, L.J. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. **Theriogenology**, v. 71, p. 254-263, 2009.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708, 2012.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R.; LONG, J.A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology**, v. 70, p. 1209-1215, 2008.

HANCOCK, J.L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. **Nature**, v. 167, p. 323, 1951.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Microscopy**, v. 76(3), p. 84-97, 1956.

HARRISON, R.A. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 52, p. 195-211, 1997.

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

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

HUO, L.J.; MA, X.H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, v. 58, p. 1349-1360, 2002.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; GROOTEN, H.J.G. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. **Zuchthygiene**, v. 23, p. 49-55, 1988.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.

JONES, J.; BAVISTER, B. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 616-624, 2000.

JUNG, M.; RÜDIGER, K.; SCHULZE, M. *In vitro* measures for assessing boar semen fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 20–24, 2015.

JUONALA, T.; LINTUKANGAS, S.; NURTTILA, T.; ANDERSSON, M. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, p. 155–158, 1998.

JUONALA, T.; SALONEN, E.; NURTTILA, T.; ANDERSSON, M. Three fluorescence methods for assessing boar sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 83–87, 1999.

KNOX, R.V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, p. 83–93, 2016.

KOPP, C.; SIRONEN, A.; IJÄS, R.; TAPONEN, J.; VILKKI, J.; SUKURA, A.; ANDERSSON, M. Infertile boars with knobbed and immotile short-tail sperm defects in the Finnish Yorkshire breed. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43(6), p. 690–695, 2008.

KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, p. 3199–3207, 2008

KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K.M.; BARDOLOI, R.K.; DAS, A.; KUMAR, S.; NASKAR, S. Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 162–171, 2009.

KUMMER, A.; GAGGINI, T.; BERNARDI, M.; MCMANUS, C.; GONÇALES, E.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 747–754, 2013.

LARSSON, K.; ERSMAR, M. Laboratory studies on frozen-thawed boar semen in relation to contemporary fertility with liquid semen of AI boars. **Zuchthygiene**, v. 15, p. 111–117, 1980.

LEE, S.-H.; PARK, C.-K. Antioxidative effects of magnetized extender containing bovine serum albumin on sperm oxidative stress during long-term liquid preservation of boar semen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, p. 467–472, 2015.

LIU, Q.; ZHOY, Y.F.; DUAN, R.J.; WEI, H.K.; JIANG, S.W.; PENG, J. Effects of dietary n-6:n-3 fatty acid ratio and vitamin E on semen quality, fatty acid composition and antioxidant status in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 162, p. 11–19, 2015.

LOVERCAMP, K.W.; SAFRANSKI, T.J.; FISCHER, K.A.; MANANDHAR, G.; SUTOVSKY, M.; HERRING, W.; SUTOVSKY, P. High resolution light microscopic evaluation of boar semen quality sperm cytoplasmic droplet retention in relationship with boar fertility parameters. **Archives of Andrology**, v. 53, p. 219–228, 2007.

LOVERCAMP, K.W.; STEWART, K.R.; LIN, X.; FLOWERS, W.L. Effect of dietary selenium on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 268–275, 2013.

MAY, N.; PATTERSON, J.L.; PINILLA, J.C.; CARPENTER, A.; TRIEMERT, E.; HOLDEN, N.; FOXCROFT, G. R.; DIXON, W.T.; WERNER, T.; DYCK, M.K. Seminal plasma proteins associated with boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50 (Suppl. 2), p. 110–118, 2015.

McPHERSON, F.J.; NIELSEN, S.G.; CHENOWETH, P.J. Semen effects on insemination outcomes in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 28–33, 2014.

MENDEZ, M.F.B.; ZANGERONIMO, M.G.; ROCHA, L.G.P.; FARIA, B.G.; PEREIRA, B.A.; FERNANDES, C.D.; CHAVES, B.R.; MURGAS, L.D.S.; SOUSA, R.V. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. **Animal**, v. 7, p. 793–798, 2013.

OLLERO, M.; GIL-GUZMAN, E.; LOPEZ, M.C.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVENSON, D.; THOMAS, A.J. JR; ALVAREZ, J.G. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1912–1921, 2001.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255–266, 1992.

PETRUJKI, B.T.; ŠEFER, D.S.; JOVANOVIĆ, I.B.; JOVIĆ, M.; JANKOVIĆ, S.; JAKOVLJEVIĆ, G.; BEIER, R.C.; ANDERSON, R.C. Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 194–205, 2014.

PETRUNKINA, A.M.; GEHLHAAR, R.; DROMMER, W.; WABERSKI, D.; TOPFER-PETERSEN, E. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. **Reproduction**, v. 121, p. 889–896, 2001.

PETRUSKA, P.; CAPCAROVA, M.; SUTOVSKY, P. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. **Turkish Journal of Veterinary & Animal**, v. 38, p. 643–652, 2014.

PINART, E.; YESTE, M.; PRIETO-MARTÍNEZ, N.; REIXACH, J.; BONET, S. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter? **Theriogenology**, v. 83, p. 1428–1437, 2015.

PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E.R. 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.

POLGE, C. Fertilization in the pig and horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 461–470, 1978.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 99–102, 1975.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Acrosome morphology of boar spermatozoa during *in vitro* aging. **Journal of Animal Science**, v. 38, p. 113-116, 1974.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 37(2), p. 528-531, 1973.

RIESENBECK, A. Review on international trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46(Suppl. 2), p. 1–3, 2011.

RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; HENNING, H.; WABERSKI, D. Quality control of boar sperm processing: Implications from European AI centres and two spermatology reference laboratories. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(Suppl. 2), p. 1-4, 2015.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 141-146, 1995.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKSTEDT, E.; EINARSSON, S. Acidification of epididymal fluid in the boar. **International Journal of Andrology**, v. 13, p. 238–243, 1990.

ROZEBOOM, K.J. Quality assurance of semen. **Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference**. Saint Paul, Minnesota, USA. p. 171- 179, 2003.

RUIZ-SÁNCHEZ, A.L.; O'DONOGHUE, R.; NOVAK, S.; DYCK, M.K.; COSGROVE, J.R.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**, v. 66, p. 736-748, 2006.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 663–677, 2000.

SANCHO, S.; VILAGRAN, I. The Boar Ejaculate: Sperm function and seminal plasma analyses. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. (Eds). **Boar Reproduction – Fundamentals and New Biotechnological Trends**. Berlin: Springer, 2013. p. 471–516.

SCHULZE, M.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; SCHMOLL, F.; GROSSFELD, R.; GRIESSLER, A. Effects on boar semen quality after infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: A case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, p. 16-24, 2013a.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; JUNG, M.; GROSSFELD, R. Use of refractometry as a new management tool in AI boar centers for quality assurance of extender preparations. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 77–82, 2015a.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; MUELLER, K.; JUNG, M.; WELL, C.; REISSMANN, M. Development of an *in vitro* index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v. 140, p. 70–76, 2013b.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 684–87, 2015b.

SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: SIES, H. (Ed.) **Oxidative Stress**. Academic Press: London, 1985. p. 1-8.

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

SIMMET, C.; RATH, D.; LORTON, S. Dose sedimentation of liquid boar semen influence semen quality during storage? **Proceedings of the 15th IPVS Congress**. Birmingham, England. v. 3, p. 62, 1998.

STRZE EK, J.; LAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Animal Science Papers and Reports**, v. 17(4), p. 181-188, 1999.

SUTKEVICIENE, N.; ANDERSSON, M.A.; ZILINSKAS, H.; ANDERSSON, M. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. **Theriogenology**, v. 63, p. 739–747, 2005.

SUTKEVICIENE, N.; RISKEVICIENE, V.; JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H.; ANDERSSON, M. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 53–59, 2009.

SUTOVSKY, P. New approaches to boar semen evaluation, processing and improvement. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50 (Suppl. 2), p. 11–19, 2015.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.-P.; CORMIER, N.; BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. **Theriogenology**, v. 52, p. 447-459, 1999.

VÁZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; PARRILLA, I.; GIL, M.A.; LUCAS, X.; ROCA, J. Motility characteristics and fertilizing capacity of boar spermatozoa stained with Hoechst 33342. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 369-374, 2002.

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

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

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

VYT, P.; MAES, D.; SYS, S.U.; RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A. Air contact influences the pH of extended porcine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 218–220, 2007.

WABERSKI, D.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A.M. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46 (Suppl 2), p. 45–48, 2011.

WABERSKI, D.; MEDING, S.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; HAHN, R. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 145-151, 1994.

WABERSKI, D.; MAGNUS, F.; ARDÓN, F.; PETRUNKINA, A.M.; WEITZE, K.F.; TÖPFER-PETERSEN, E. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium *in vitro* in relation to sperm morphology and storage time. **Reproduction**, v. 131, p. 311–318, 2006.

WATERHOUSE, K.E.; DE ANGELIS, P.M.; HAUGAN, T.; PAULENZ, H.; HOFMO, P.O.; FARSTAD, W. Effects of *in vitro* storage time and semen extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**, v. 62, p. 1638–1651, 2004.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481–492, 2000.

WHO. World Health Organization. **Laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5th ed. World Health Organization: Geneva, 2010. 287 p.

WOELDERS, H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl., p. 145-164, 1991.

XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTO, W.; FOXCROFT, G. R. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3079-3089, 1998.

YOUNG, B.; DEWEY, C.; FRIENDSHIP, B. The effect of on- farm semen storage temperature on stored semen quality. **Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians**. Toronto, Ontario, Canada. p. 357- 360, 2005.

ZHANG, X.G.; YAN, G.J.; HONG, J.Y.; SU, Z.Z.; YANG, G.S.; LI, Q.W.; HU, J.H. Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50(2), p. 263-269, 2015.