



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

**“TRANSPORTE DE DOSES INSEMINANTES: IMPACTO DA DURAÇÃO DA  
EMISSÃO DE VIBRAÇÕES SOBRE PARÂMETROS DE QUALIDADE DE  
CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE SUÍNOS”**

**MAYARA DE SOUZA COSTA TAMANINI**

**PORTO ALEGRE**

**2022**



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

**“TRANSPORTE DE DOSES INSEMINANTES: IMPACTO DA DURAÇÃO DA  
EMISSÃO DE VIBRAÇÕES SOBRE PARÂMETROS DE QUALIDADE DE  
CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE SUÍNOS”**

**Autor:** Mayara de Souza Costa Tamanini

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução.

**Orientador(es):** Profa. Dra. Ana Paula Mellagi & Prof. Dr. Ivo Wentz.

**Coorientador:** Dr. Martin Schulze

**PORTO ALEGRE**

**2022**

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

CIP - Catalogação na Publicação

Tamanini, Mayara de Souza Costa  
TRANSPORTE DE DOSES INSEMINANTES: IMPACTO DA  
DURAÇÃO DA EMISSÃO DE VIBRAÇÕES SOBRE PARÂMETROS DE  
QUALIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE SUÍNOS / Mayara  
de Souza Costa Tamanini. -- 2022.  
51 f.  
Orientadores: Ana Paula Gonçalves Mellagi, Ivo  
Wentz.

Coorientador: Martin Schulze.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Suinocultura. 2. Reprodução Suína. 3.  
Inseminação Artificial. 4. Transporte de doses  
inseminantes. 5. Central de Processamento de Sêmen. I.  
Mellagi, Ana Paula Gonçalves, orient. II. Wentz, Ivo,  
orient. III. Schulze, Martin, coorient. IV. Título.

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

Mayara de Souza Costa Tamanini

“TRANSPORTE DE DOSES INSEMINANTES: IMPACTO DA DURAÇÃO DA EMISSÃO DE VIBRAÇÕES SOBRE PARÂMETROS DE QUALIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE SUÍNOS”.

Aprovada em 10 MAR 2022

APROVADO POR:

---

Prof. Dra. Ana Paula Mellagi  
Coorientadora e Presidente da comissão

---

Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade  
Membro da comissão

---

Dr. Rogério Oliveira Pinho  
Membro da comissão

---

Prof. Dra. Thaís Schwarz Gaggini  
Membro da comissão

Porto Alegre, 10 de março de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar até aqui e me mostrar que o melhor caminho é aquele que me foi confiado por Ti. “Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar (Josué 1:9)”.

À minha mãe e minha avó Luzia, mulheres que são minha base, me inspiram, me amparam e me impulsionam a ser alguém melhor.

Ao meu pai, por todo o auxílio nesse período e ao meu padrasto, por sempre me lembrar da minha capacidade e do quanto eu ainda posso conquistar.

Ao meu irmão Bernardo, sem dúvidas, a razão do meu existir. Tudo que faço é para garantir um futuro próspero e confortável para ti. Eu te amo incondicionalmente.

Ao Marcos Saldanha, por ser uma pessoa tão incrível, me receber com carinho, amor, compreensão, paciência e disposição. Obrigada por me deixar ficar e fazer essa caminhada mais leve. “Entre tantos anos, entre tantos outros, que sorte a nossa, hein?”.

Ao Sr. Áureo e Zelir Moraes, por me auxiliarem no início dessa caminhada e me dispor de suporte ao longo dela. Vocês sempre serão minha família, independente de tudo.

Às minhas amigas de vida, obrigada por entenderem minha ausência e torcerem por mim. Em especial, à Michele Dias, que chorou meus choros, vibrou a minha felicidade e nunca me deixou desistir. Somos marcadas por um elo eterno.

Aos colegas da minha turma de mestrado, pelos momentos de convivência e aprendizado. Em especial ao Guilherme dos Santos pelo companheirismo ao longo de todo o experimento e mestrado.

Aos estagiários e futuros colegas de profissão Leonardo Abreu e Lucas Wolf, por todo empenho em fazer dar certo. Vocês são incríveis!

A todos os professores do Setor de Suínos da UFRGS por toda ajuda, orientação e ensinamentos. Ao Dr. Martin Schulze, por todo o auxílio para realização do experimento. Em especial, minha coorientadora Ana Paula Mellagi, por se tornar uma grande inspiração e amiga.

A todos os funcionários da ACSURS, por todo auxílio e disponibilidade para realização do experimento.

À Minitube do Brasil pelo apoio financeiro para a execução do experimento.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada, nesse plano, ou em um plano superior. Muito obrigada!

## RESUMO

TRANSPORTE DE DOSES INSEMINANTES: IMPACTO DA DURAÇÃO DA EMISSÃO DE VIBRAÇÕES SOBRE PARÂMETROS DE QUALIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE SUÍNOS.

Autor: Mayara de Souza Costa Tamanini

Orientador: Profa. Ana Paula Gonçalves Mellagi & Prof. Ivo Wentz

Coorientadores: Dr. Martin Schulze

O transporte de doses inseminantes é uma prática comumente realizada na suinocultura, principalmente devido à grande utilização da inseminação artificial no cenário mundial. Durante o transporte, são emitidas vibrações que afetam os parâmetros de qualidade espermática, porém, até o momento, pouco se sabe sobre o efeito do tempo de transporte na qualidade de doses. O estudo teve como objetivo verificar o efeito do tempo de agitação em relação aos parâmetros espermáticos, em doses diluídas utilizando dois diluente. Um ejaculado normospermico de cada macho (n=20) foi diluído em *split sample* em Androstar® Plus (LONG) e Beltsville Thawing Solution (SHORT). As doses foram embaladas em tubos de 60 mL (QuickTip Flexitube®, Minitüb GmbH), com um volume total de 45 ml e 1,5 bilhão de células espermáticas por dose. As doses de sêmen foram submetidas a 0, 3, 6 e 12 horas de agitação em um *shaker* orbital a 70 rpm. As amostras foram armazenadas a 17 °C por 120 h. Os parâmetros espermáticos foram avaliados para motilidade espermática e integridade da membrana plasmática com SYBR-14/PI por meio do sistema CASA. Os defeitos acrossomais sob microscopia de contraste de fase, teste de termoresistência (TTR) a 38°C por 30 e 300 min, pH, estresse oxidativo e potencial de membrana mitocondrial também foram analisados. Os resultados mostraram que as motilidades total e progressiva foram afetadas pela interação entre o tempo de agitação e o diluente, com redução linear conforme se aumenta o tempo de agitação para o diluente LONG ( $P < 0,02$ ). Para os valores de pH, as doses diluídas com SHORT demonstraram maiores valores ( $P < 0,01$ ) e o tempo de agitação demonstrou um efeito quadrático positivo com os maiores valores observados em 6 h de agitação para ambos os diluentes ( $P < 0,01$ ). Um aumento na porcentagem de defeitos de acrossoma foi observado com o uso do diluente SHORT ( $P < 0,03$ ). O TTR, integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial, não foram afetados pelo tempo de agitação ou interações ( $P \geq 0,05$ ). Uma interação quadrática negativa para o estresse oxidativo foi observada com o aumento do tempo de agitação, quando utilizado SHORT ( $P = 0,01$ ). Nesse estudo, a longa duração da emissão de vibrações influencia na qualidade de doses inseminantes de suínos. Além disso, o diluente de longa duração não mitigou o efeito de uma simulação de transporte a longo prazo. O mecanismo preciso da duração da emissão de vibrações emitidas no transporte sobre os parâmetros espermáticos ainda não foi elucidado.

**Palavras-chave:** Agitação das doses. Espermatozoide suíno. Expedição das doses. Inseminação artificial. Qualidade seminal.

## ABSTRACT

### TRANSPORT OF SEMEN DOSES: IMPACT OF VIBRATION EMISSION DURATION ON BOAR SEMEN PARAMETERS

*Author: Mayara de Souza Costa Tamanini*

*Advisor: Profa. Ana Paula Gonçalves Mellagi & Prof. Ivo Wentz*

*Co-advisors: Dr. Martin Schulze*

*Transport of extended boar semen doses is a common practice performed in swine industry, mainly due to the great use of artificial insemination in the world scenario. During transport, high vibrations emissions affect sperm quality parameters; however, little is known so far about the effect of long transport time under mild vibration. Therefore, this study aimed to verify the effect of agitation time regarding sperm parameters during storage in two semen extenders. One normospermic ejaculate from each boar (n=20) was diluted in a split sample design with LONG (Androstar® Plus) and SHORT (Beltsville Thawing Solution) extenders. Extended semen doses were filled in 60 mL tubes, with a total volume of 45 mL and 1.5 billion sperm cells. Extended semen doses were submitted to 0, 3, 6 and 12 h of agitation in an orbital shaker at 70 rpm. The samples were stored at 17 °C for 120 h. Sperm parameters were evaluated for sperm motility and plasma membrane integrity with SYBR-14/PI using the CASA system. Acrosomal defects under phase contrast microscopy, thermo-resistance test (TRT) at 38°C for 30 and 300 min, pH, oxidative stress status and mitochondrial membrane potential were also analyzed. The results showed that total and progressive motility were affected by the interaction between the agitation time and the extender, with a linear reduction as the agitation time increased for LONG extender ( $P < 0.02$ ). Semen doses diluted with SHORT showed higher pH ( $P < 0.01$ ) and the agitation time showed a positive quadratic effect with the highest pH observed in 6 h of agitation, for both extenders ( $P < 0.01$ ). An increase in the percentage of acrosome defects was observed with the use of SHORT extender ( $P = 0.03$ ). TTR, plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential were not affected by agitation time or interactions ( $P \geq 0.05$ ). Using SHORT extender, a negative quadratic effect was observed with increased agitation time ( $P = 0.01$ ) for oxidative stress status. This study has shown that long transport duration under mild vibration influence on boar extended semen doses quality. Furthermore, the use of a long-term extender seemed to fail in mitigate the effect of long transport time. The precise mechanism of transport duration in boar sperm traits remains to be elucidated.*

**Keywords:** *Artificial insemination. Boar spermatozoa. Semen agitation. Semen quality. Shipping.*

## LISTA DE TABELAS

### Tabelas inseridas no artigo científico

**Table 1.** Sperm parameters of boar semen doses according to storage time (24, 72 and 120 h), agitation time (0, 3, 6 and 12h) and extenders (SHORT and LONG) (n=20 boars). .....35

**Table 2.** Sperm parameters of boar semen doses after thermoresistance test (TRT) at 38°C performed at 72 and 120 h of storage, according to incubation time (30 and 300 minutes), agitation time (0,3, 6 and 12h) and extenders (SHORT and LONG) (n=20 boars). .....36



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras inseridas no artigo científico

- Figure 1.** Schematic view of the experimental design. Each ejaculate from different boars (n = 20) was diluted in a split sample design in SHORT and LONG extender. After the stabilization period (120 minutes) at 22-24°C, extended semen doses were agitated at 17 °C in a dark room, according to the treatment (0, 3, 6 and 12 h). The 0-h treatment doses were stored in temperature-controlled unit and were not submitted to agitation. After agitation time, extended semen doses were stored in temperature-controlled unit at 17°C for up to 120 h.....28
- Figure 2.** Effect of the interaction between agitation time (AT; 0, 3, 6 and 12 hours) and extender (E) (Long-term, LONG and short-term extender, SHORT) on total (A) and progressive (B) sperm motility of boar semen doses (n=20 boars). Values are expressed as means ± SEM (standard error mean).....32
- Figure 3.** Comparison of slope responses regarding the acrosome defects according to the interaction (P = 0.03) between the agitation time (AT) (0, 3, 6 and 12 h) and storage time (ST) (24, 72 and 120 h) on boar semen doses (n=20 boars). Values are expressed as the means ± SEM (standard error mean). .....33
- Figure 4.** Comparison of slope responses regarding intracellular DCF quantification according to the interaction (P = 0.01) between the agitation time (0, 3, 6 and 12 h) and extender (Long-term, LONG and short-term extender, SHORT) on boar semen doses (n=20 boars). Values are expressed as the means ± SEM (standard error mean).....34

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção de doses inseminantes .....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Análises iniciais.....	13
2.1.2	Diluição e Diluentes .....	14
2.1.3	Armazenamento.....	15
<b>2.2</b>	<b>Avaliações in vitro da qualidade espermática .....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Motilidade espermática .....	16
2.2.2	Morfologia espermática e integridade de acrossoma .....	17
2.2.3	Integridade de membrana plasmática .....	18
2.2.4	Estresse oxidativo.....	19
2.2.5	Potencial de membrana mitocondrial .....	20
2.2.6	pH.....	21
2.2.7	Teste de termorresistência (TTR).....	21
<b>2.3</b>	<b>Transporte de doses inseminantes .....</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) na reprodução de suínos tornou-se a biotécnica mais empregada na suinocultura atual devido aos ótimos resultados e benefícios nas últimas décadas (BORTOLOZZO *et al.*, 2015). Cerca de 95% das matrizes suínas dos plantéis tecnificados dos principais países produtores, com exceção da China, são inseminadas (WABERSKI *et al.*, 2019).

Para que se obtenha o sucesso no uso da IA, alguns desafios devem ser considerados além do manejo reprodutivo das fêmeas, mas também os fatores relacionados aos cuidados com as doses inseminantes, tanto no laboratório durante a produção, quanto no transporte e armazenamento das doses na granja (SCHULZE *et al.*, 2019a).

Com os grandes avanços no uso da IA, tornaram-se necessárias a centralização e a profissionalização da produção de doses inseminantes em centrais de produção de sêmen (CPS). Adquirir doses de uma CPS garante a utilização de doses inseminantes produzidas através de um rigoroso controle de qualidade, além de um rápido avanço genético, com reposição anual de machos superior a 80% (MELLAGI *et al.*, 2019).

Atualmente, há cerca de 1,9 milhão de fêmeas (ABPA, 2021) e 15 mil machos reprodutores suínos no plantel brasileiro. Diante desse cenário, é importante que os reprodutores demonstrem um desempenho reprodutivo satisfatório, complementando com a implantação de rígidos protocolos de controle de qualidade na produção de doses inseminantes, com finalidade de não comprometer os índices reprodutivos.

Vários manejos são adotados na tentativa de minimizar fatores que possam comprometer a qualidade da dose inseminante, principalmente o controle da contaminação bacteriana, mas também a avaliação do número de células espermáticas/dose e análises de morfologia para garantir os padrões pré-estabelecidos pelo Conselho Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Além disso, estudos recentes trouxeram quebras de paradigmas em relação aos manejos adotados às doses inseminantes, demonstrando que o comprometimento na qualidade de doses não pode ser exclusivamente associado às etapas de coleta e processamento do sêmen, mas também à manipulação das doses durante o armazenamento. Menegat *et al.* (2017) demonstraram que a homogeneização manual duas vezes ao dia das doses inseminantes geram efeitos negativos durante o armazenamento. Já Schulze *et al.* (2018), associaram o transporte com danos na qualidade de células espermáticas das doses. Assim, dados recentes mostram que a manipulação incorreta das doses pode comprometer a qualidade espermática.

No Brasil, é comum que longas distâncias sejam percorridas para realização da entrega das doses inseminantes, tendo como desafios o tempo e a emissão de vibrações que ocorre ao longo do transporte. Atualmente, pouco se sabe sobre os efeitos causados pela emissão das vibrações. No entanto, o grau de vibrações emitidas durante o transporte exerce um efeito frequência-dependente na qualidade espermática (SCHULZE *et al.*, 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto das vibrações em doses inseminantes produzidas com diluentes de curta e longa duração, submetidas à simulação de transporte após diferentes durações de tempo de exposição às vibrações. Os resultados obtidos poderão auxiliar na tomada de decisão sobre qual o tempo ideal para submeter as doses inseminantes ao transporte, sem gerar prejuízos significativos nos parâmetros de qualidade das células espermáticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Produção de doses inseminantes

#### 2.1.1 Análises iniciais

Logo após a coleta, o ejaculado deve ser encaminhado ao laboratório para análise. A primeira avaliação é macroscópica, em que verifica-se a coloração do ejaculado, que na sua normalidade é branco acinzentado ou branco; e quando há componentes que podem alterar a coloração do ejaculado, pode-se visualizar colorações amarronzada ou avermelhada, causadas por bactérias, sangue, urina, entre outros fatores que determinam o descarte do ejaculado. O aspecto do ejaculado está relacionado à concentração espermática, podendo ser aquoso, soroso, soroleitoso ou leitoso-denso, no entanto, é um parâmetro que não deve ser utilizado para determinação exata do número de espermatozoides do ejaculado, devido à baixa acurácia (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). O ejaculado suíno possui o odor denominado de *sui generis*, um odor característico. Na presença de urina, conteúdo prepucial ou infecções, o odor torna-se diferenciado e perceptível, recomendando-se o descarte do ejaculado (BORTOLOZZO *et al.*, 2008).

O volume é uma medida importante para a determinação do número de espermatozoides do ejaculado, que posteriormente indicará o número de doses que serão produzidas. Inicialmente, o volume é aferido por pesagem em balança, assumindo que 1 mL de sêmen equivale a 1 g. Para determinar a concentração do ejaculado, há diversos métodos que podem ser utilizados: contagem direta dos espermatozoides em câmara hemocitométrica, a espectrofotometria, o espermodensímetro de Karras e a contagem computadorizada de espermatozoides, além de métodos eletrônicos de contagem.

O uso de câmeras hemocitométricas para a contagem de espermatozoides é o método mais preciso, com baixo custo e permite a contagem direta das células (BRITO *et al.*, 2016). A câmara mais utilizada na área da reprodução é a de Neubauer. Porém, apesar de ser o método padrão ouro, a avaliação na câmara hemocitométrica demanda tempo para ser realizada, pois além do preparo da câmara, há a espera para leitura e contagem das células, para posterior aplicação de uma fórmula que determinará o número de células/mL, indicado apenas para centrais pequenas e com pouco fluxo de produção (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por Schulze e Rudiger (2014), os autores observaram que 20 de 23 CPS da Europa determinavam a concentração por espectrofotometria e apenas três pelo sistema

CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis systems*). Já em relação às CPS norte-americanas, observou-se que 26 de 44 determinavam a concentração a partir da espectrometria, 12 utilizavam o sistema CASA e apenas 2% determinavam a partir da câmara hemocitométrica (KNOX *et al.*, 2008). No Brasil, estima-se que 46% das CPS determinam a concentração pelo CASA, enquanto 34% utilizam a espectrofotometria (BENNEMANN *et al.*, 2020).

### 2.1.2 Diluição e Diluentes

No processo de diluição do sêmen suíno, dois protocolos são mais utilizados: a diluição em uma etapa (*one step*), que consiste em diluir o ejaculado isotermicamente (32-34 °C) em até 30 minutos após a coleta e a diluição em duas etapas (*two-steps*), com uma diluição isotérmica inicial na proporção de 1:1 ou 1:2 e após 10 minutos, realiza-se a diluição final, que pode ser isotérmica ou hipotérmica (21-24 °C) (WABERSKI, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2015). A diluição em duas etapas tem como propósito oferecer um lento equilíbrio de pH e osmolaridade, evitando dessa forma, a ocorrência de choque térmico e osmótico nas células espermáticas, porém, não encontrou-se diferença entre as duas técnicas em relação aos parâmetros espermáticos (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A produção das doses inseminantes ocorre por meio da diluição do sêmen *in natura* em diluente. O diluente desempenha funções importantes para manter a integridade dos espermatozoides; entre elas, a manutenção do metabolismo espermático pelo fornecimento de glicose, controle de pH por tamponantes como bicarbonato de sódio, citrato de sódio, TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) e HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazin etanosulfônico). Além disso, há a regulação da pressão osmótica pelo NaCl e KCl e o controle do crescimento bacteriano, por meio do uso de antimicrobianos, como a gentamicina (GADEA, 2003; BUSSALLEU; TORNER, 2013).

Na Europa, as doses inseminantes são produzidas para inseminação artificial cervical, variando em 70-100 mL de volume, com número total de células espermáticas de  $1,5 - 2,5 \times 10^9$  e, para inseminação artificial intrauterina, com volume entre 30-50 mL e concentração de  $1,0$  a  $2,0 \times 10^9$  de células espermáticas (WABERSKI *et al.*, 2019). Já no Brasil, o cenário é diferente: doses para inseminação artificial cervical com  $2,0 - 3,0 \times 10^9$  e 80 – 100 mL de volume e doses para inseminação artificial intrauterina com 45 – 60 mL de volume com  $1,5 - 1,8 \times 10^9$  de células na dose.

Componentes adicionais podem ser incorporados aos diluentes, como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para prevenir a reação acrossomal prematura, a BSA (albumina

sérica bovina) para proteção das membranas, e antioxidantes para auxiliar na compensação da oxidação (JOHNSON *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2015).

Os diluentes geralmente são classificados conforme a sua duração de ação: curta, média e longa, garantindo a integridade das células espermáticas em até três, quatro a cinco, e sete a dez dias, respectivamente (GADEA, 2003). O BTS é o diluente de curta duração mais utilizado, caracterizando-se por conter baixa quantidade de potássio sendo ideal para CPS com proximidade as granjas que utilizam as doses inseminantes em até três dias (BUSSALLEU; TORNER, 2013; KNOX, 2016a).

Os diluentes de média e longa duração possuem uma formulação mais complexa, com a adição de protetores de membrana, tampões anfóteros (ácido ou base) e antioxidantes (BUSSALLEU; TORNER, 2013; KNOX, 2016a). Além disso, Waberski *et al.* (2019), ao comparar o BTS (diluente de curta duração) com o Androstar® Premium (diluente de longa duração), demonstraram que o armazenamento a 5 °C por 72 h foi possível com Androstar® Premium. Portanto, além do tempo de conservação, a eficiência de diluentes de longa duração tem sido explorada e demonstra resultados satisfatórios em uma faixa de temperatura mais ampla.

### 2.1.3 Armazenamento

Após o envase das doses e antes do armazenamento, recomenda-se que as doses permaneçam à temperatura ambiente do laboratório (em torno de 22 °C) para que ocorra o processo de estabilização (WABERSKI, 2009). A estabilização da temperatura das doses deve ocorrer de forma gradativa, para evitar choque térmico e desordem na fase lipídica da membrana e, ainda, defeitos na morfologia das células espermáticas, como a cauda enrolada (SCHULZE *et al.*, 2015b). Recomenda-se que o período de estabilização das doses ocorra em 90 minutos, tanto na diluição em uma única etapa quanto em duas etapas de forma isotérmica, com redução de 0,11 °C/min quando considerado uma taxa de resfriamento de 33-34 °C até 22-24 °C.

Durante décadas a prática da homogeneização das doses foi realizada durante o período de armazenamento, a fim de diminuir os efeitos negativos da sedimentação dos espermatozoides. No entanto, ao comparar doses armazenadas sem rotação e doses submetidas a rotação manual duas vezes ao dia ou em rotação automática permanente (cinco rotações por hora), Schulze *et al.* (2015b) verificaram 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 termoresistência nas doses submetidas à rotação. Ainda, a homogeneização manual duas vezes ao dia demonstrou ser prejudicial a motilidade e cinética espermáticas após o teste de termoresistência (MENEGAT *et al.*, 2017). Diante desses resultados recentes, passou-se a não recomendar a prática da homogeneização das doses durante o armazenamento e essa instrução já é seguida pela Associação de Pesquisas Bioeconômicas, na Alemanha (SCHULZE *et al.*, 2019b).

## 2.2 Avaliações *in vitro* da qualidade espermática

Para garantir o sucesso dos protocolos de inseminação artificial, é essencial que as CPS produzam doses inseminantes de qualidade e com garantia de longevidade (RIESENBECK *et al.*, 2015). De forma geral, as CPS têm como prática armazenar uma amostra ou contraprova dos ejaculados ou doses produzidas para o comércio. Essa ação tem como objetivo avaliar a durabilidade e qualidade das doses com análises de motilidade espermática ao longo do armazenamento (ALKMIN, 2019). Além disso, é comum que as CPS enviem amostras para análises em laboratórios externos, como de motilidade espermática, morfologia e exame bacteriológico. Ao implementar os protocolos de controle de qualidade, maior segurança do processo é promovida às CPS, com possibilidade de identificar fatores que prejudicam a qualidade espermática e adoção de planos de ações para solucionar os problemas encontrados.

### 2.2.1 Motilidade espermática

A motilidade espermática é o principal parâmetro utilizado para determinar se o ejaculado será aceito para a produção de doses inseminantes, sendo um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e penetração no oócito (BERNARDI, 2008). Segundo Flowers (1997), ao utilizar doses inseminantes produzidas a partir de um ejaculado com menos de 60% de motilidade espermática, há um comprometimento na taxa de parto e tamanho da leitegada. Portanto, de forma preventiva a eventuais falhas reprodutivas, considera-se o valor mínimo de 70% de motilidade para aprovação não só do ejaculado, mas também para uso das doses (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

A avaliação da motilidade espermática pode ser realizada de maneira subjetiva, através de um microscópio óptico, sendo o método mais barato e prático de avaliação. Porém, há uma grande variabilidade nos resultados da análise, pois depende do treinamento do avaliador (BROEKHUIJSE *et al.*, 2011). Já no sistema CASA ocorre a captação da movimentação



individual das células espermáticas pelo deslocamento das cabeças, sendo possível detectar mudanças sutis no movimento através do processamento dessas informação por meio de um computador, permitindo uma análise objetiva, confiável e acurada (AMANN; KATZ, 2004).

A associação da motilidade espermática com parâmetros de fertilidade é bastante explorada; entretanto, alguns estudos demonstram que a motilidade espermática do ejaculado explica minimamente a variação de fertilidade (apenas 4%) (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012). Já quando a avaliação é realizada no sêmen diluído armazenado por um período de até sete dias, a motilidade total apresenta influência sobre o tamanho da leitegada (JUONALA *et al.*, 1998). Além disso, a avaliação da motilidade progressiva de doses inseminantes diluídas em diluente de curta ação e armazenadas por 120 h pode auxiliar na seleção de machos com maior fertilidade (LUCCA *et al.*, 2021). Portanto, para melhor prever a fertilidade dos machos suínos, a análise de motilidade realizada durante o período de armazenamento das doses inseminantes demonstra ser uma técnica interessante.

### 2.2.2 Morfologia espermática e integridade de acrossoma

O objetivo das análises de morfologia espermática é fornecer uma estimativa qualitativa do funcionamento do epitélio seminífero e da função epididimária (GADEA, 2005). Mesmo em reprodutores saudáveis, espera-se uma certa proporção de espermatozoides morfológicamente anormais, porém, apenas quando excede-se o limite aceitável de defeitos morfológicos é que o desempenho reprodutivo pode ser afetado (JUNG; RÜDIGER; SCHULZE, 2015).

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), o ideal é que seja realizada a contagem de 200 células espermáticas e considera-se normal para o sêmen *in natura* e para as doses inseminantes, valores até 30 e 20% de defeitos morfológicos totais, respectivamente. Individualmente, aceita-se no máximo 5% de defeitos de cabeça, acrossoma, colo ou peça intermediária e 10% de defeitos de gota citoplasmática proximal e cauda. As técnicas utilizadas para a avaliação de morfologia espermática são as de coloração dos espermatozoides com: eosina-nigrosina, Trypan Blue ou Giemsa, fixação dos espermatozoides em formol e a preparação úmida (HANCOCK, 1956; FOXCROFT, 2008). No entanto, o exame também pode ser realizado pelo sistema CASA, com o recurso de análise morfológica (FOXCROFT, 2008). A periodicidade da análise de morfologia deve levar em consideração o período da espermatogênese completa, que ocorre aproximadamente a cada 40 dias (FRANÇA;

AVELAR; ALMEIDA, 2005). Além disso, todos os machos jovens devem ser avaliados para introdução nas CPS (BORTOLOZZO *et al.*, 2008).

As anormalidades de morfologia espermática podem ser classificadas em primárias, oriundas de má formação celular na espermatogênese ou espermiogênese, e anormalidades secundárias, oriundas do processo de maturação das células no epidídimo. Também é possível identificar defeitos causados pelo processamento do ejaculado, chamados de defeitos terciários (BRIZ; FÀBREGA, 2013). As alterações de cabeça representam uma subpopulação de células ejaculadas e geralmente estão relacionadas à genética, raça ou idade do reprodutor (FLOWERS, 2004; KNOX, 2016b). Os defeitos mais comuns de serem encontrados em um exame de morfologia são a presença de gota citoplasmática proximal e distal (KNOX, 2016b) que ocorrem principalmente pela maturação incompleta da célula e pela diminuição do intervalo de coleta, idade ou estresse (FLOWERS, 2004).

Já os defeitos de caudas dobradas e enroladas podem estar relacionados com condições externas, como temperatura, pH, osmolaridade, radiação UV, contaminações e outros fatores extrínsecos (KNOX, 2016b). O acrossoma é parte fundamental do espermatozoide, nessa estrutura estão contidas as enzimas essenciais para que ocorra a fecundação, como a acrosina e hialuronidase. Os defeitos acrossomais podem ocorrer durante a formação e maturação espermática, mas também em condições de choque térmico e osmótico, contaminação bacteriana e danos mecânicos (FLOWERS, 2004). Além disso, o acrossoma também pode ser afetado pelo armazenamento, devido a reações semelhantes à capacitação espermática. A avaliação do acrossoma identifica células com degeneração, má formação ou danos estruturais, localizados na porção apical, que pode estar destacada, ausente ou danificada (PURSEL *et al.*, 1972). A avaliação dessa estrutura é de grande importância, já que a cabeça com morfologia alterada e conseqüente redução das enzimas no acrossoma, resultam em dificuldade de penetração e redução no processo de fecundação (FLOWERS, 2004).

### 2.2.3 Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é um parâmetro importante a ser considerado na determinação da fertilidade, devido à sua importância para a sobrevivência das células. A avaliação se baseia na entrada ou não de determinados corantes ou sondas fluorescentes no interior do espermatozoide. Dessa forma, é possível identificar as células que possuem membranas íntegras, classificadas como viáveis e células com algum dano à membrana, classificadas como não viáveis (SILVA; GADELLA, 2006). Segundo Johnson *et al.* (2000), os

ejaculados de alta qualidade devem possuir 80-90% de espermatozoides com membranas íntegras, ou seja, espermatozoides viáveis.

O sistema CASA equipado com módulo de viabilidade espermática, pode ser utilizado para avaliação de integridade de membranas (AMANN; WABERSKI, 2014). Cada corante ou sonda fluorescente possui determinado comprimento de onda para excitação e emissão da fluorescência (SILVA; GADELLA, 2006).

As sondas permeáveis, como o SYBR-14, possuem característica anfipática, devido ao agrupamento acetila. Essas sondas são desacetiladas por esterases assim que entram nas células, tornam a sonda impermeável à membrana plasmática, impossibilitando a saída nas células consideradas viáveis (GARNER; JOHNSON, 1995; SILVA; GADELLA, 2006). Já as sondas impermeáveis, como o iodeto de propídeo (PI) são capazes apenas de penetrar em células com membranas danificadas, emitindo fluorescência quando se ligam ao DNA das células inviáveis (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

A associação das sondas SYBR-14 e PI é bastante utilizada, pois permite a determinação de espermatozoides viáveis e não viáveis na mesma amostra e requer um tempo curto de incubação, de no máximo 15 minutos (JOHNSON *et al.*, 2000). O SYBR-14 emite fluorescência de cor verde (488/515 nm) e determina os espermatozoides viáveis, já o PI identifica os espermatozoides inviáveis pela fluorescência da cor vermelha (488/620 nm) (GARNER; JOHNSON, 1995).

#### 2.2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica que ocorre devido ao desequilíbrio na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS). As EROS são produzidas como intermediárias no processo de redução-oxidação (redox) e possuem também papel fisiológico. As principais EROS produzidas pelos mamíferos são: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), produzidos a partir do oxigênio molecular; radical hidroxila ( $\bullet OH$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e são majoritariamente produzidas pelas mitocôndrias. (GUTHRIE; WELCH, 2012; SUTOVSKY, 2015).

A preservação do sêmen suíno tende a ser crítica quanto ao controle do dano oxidativo aos espermatozoides e a produção elevada de EROS ou a redução na quantidade de antioxidantes, podem gerar o estresse oxidativo (SIES, 1985; KUMARESAN *et al.*, 2009). A baixa produção de EROS pelos espermatozoides é importante para que a fecundação, capacitação espermática e fusão com oócito ocorra (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR,

2009). As principais enzimas antioxidantes encontradas nos espermatozoides de mamíferos são a superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase. O plasma seminal é considerado uma fonte essencial de antioxidantes e atua diretamente na neutralização dos radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo (AITKEN, 1995).

Uma das técnicas de avaliação do estresse oxidativo dos espermatozoides, utiliza a sonda fluorescente 2',7'-dicloro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), que penetra a membrana das células espermáticas e permite a mensuração das EROS. A diclorofluorescina (DCFH) é um produto não fluorescente que quando em contato com espécies reativas é convertido em diclorofluoresceína (DCF), emitindo fluorescência (KHOSRAVI *et al.*, 2014).

### 2.2.5 Potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria é essencial para o funcionamento da célula espermática e geração de energia, por meio da produção de ATP (adenosina trifosfato), permitindo o movimento celular (CÂMARA; GUERRA, 2008) e se localizam na peça intermediária. Quando algum dano é causado a esta estrutura, pode provocar alterações em outros parâmetros espermáticos, observados principalmente na motilidade (GRAVANCE *et al.*, 2000) e estresse oxidativo (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial tem como objetivo identificar a capacidade das mitocôndrias em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, por meio da energia livre que é gerada pelo transporte de elétrons (REERS, 1991; ANGRIMANI *et al.*, 2015). Pode-se utilizar sondas fluorescentes para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Essas sondas se difundem pela membrana plasmática até o interior da célula, acumulando eletroforicamente na matriz mitocondrial metabolicamente ativa (CELEGHINI *et al.*, 2007). A sonda JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) é capaz de identificar as diferenças de potencial mitocondrial e quando ocorre a formação de monômeros de carbocianinas, há a emissão de fluorescência verde (baixo potencial mitocondrial). Já quando há agregados de monômeros, resultando em multímeros (J-agregados), a fluorescência emitida é de coloração laranja (alto potencial mitocondrial) (REERS, 1991; ANGRIMANI *et al.*, 2015).

### 2.2.6 pH

A mensuração do pH é uma análise rápida, fácil e de baixo custo. Na espécie suína, o pH do sêmen pode variar entre 7,2 e 7,5. No entanto, para que o metabolismo celular seja diminuído durante o armazenamento das doses inseminantes, os diluentes apresentam um pH próximo a 7,0 (JOHNSON *et al.*, 2000). O pH interno da célula espermática é influenciado pelo pH do meio em que se encontra; desta forma, se correlaciona diretamente com a motilidade da célula (GATTI *et al.*, 1993).

Ao longo do armazenamento, as alterações no valor de pH devem ser um alerta. A acidificação pode indicar contaminação bacteriana (GOLDBERG *et al.*, 2017), devido a produção de ácido láctico por algumas bactérias (VYT *et al.*, 2004). Por outro lado, o aumento do pH ao longo do armazenamento das doses inseminantes está associado com a redução na motilidade espermática, devido uma maior motilidade basal inicial no armazenamento, resultando em gasto energético, depleção de nutrientes e, por fim, a exaustão espermática (JONES & BAVISTER, 2000).

### 2.2.7 Teste de termorresistência (TTR)

O TTR tem como objetivo avaliar a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, simulando a temperatura corporal da fêmea suína (TARDIF *et al.*, 1999), este destaca danos que não aparecem imediatamente após a ejaculação ou processamento do sêmen (FISER *et al.*, 1991). Os primeiros protocolos descritos utilizam a incubação de 10 mL de sêmen ou dose inseminantes em banho-maria a 37 °C por 180 min (LARSSON; EINARSSON, 1976) e a 42,5 °C por 45 min (FISER *et al.*, 1991). No entanto, Schulze *et al.* (2013) adaptaram um protocolo com incubação de amostras de 10 mL (sêmen ou dose inseminante), em banho-maria a 38°C e, avaliadas após 30 min e 300 min. Posteriormente a incubação, as amostras são avaliadas quanto aos parâmetros espermáticos, principalmente a motilidade (TARDIF *et al.*, 1999). Recentemente, observou-se que algumas características de cinética espermática avaliadas após o TTR e analisadas no sistema CASA podem prever a fertilidade (SCHULZE *et al.*, 2013), apesar de estudo prévio não encontrar essa relação do TTR com a fertilidade *in vivo* (TARDIF *et al.*, 1999).

## 2.3 Transporte de doses inseminantes

As doses inseminantes produzidas pela CPS são enviadas para as granjas através de transporte rodoviário e a tendência é que com a centralização e profissionalização da produção de doses inseminantes, que percursos mais longos sejam realizados. Há diversos cenários de transportes de doses inseminantes, desde protocolos mais rígidos com controle de temperatura e velocidade, até cenários onde não há controle desses fatores.

Em estudo recente, Schulze *et al.* (2018) desenvolveram um aplicativo de detecção em tempo real para mensurar a emissão de vibrações que ocorre durante o transporte das doses inseminantes. Após a detecção, comparou-se doses que não foram submetidas a emissões de vibrações, com doses agitadas por um *shaker* a 100 rpm e 300 rpm, simulando o transporte em rodovias com pouco impacto e rodovias com muito impacto, respectivamente. Os autores demonstraram que as vibrações emitidas a 300 rpm ao longo do transporte são prejudiciais às células espermáticas, com redução da motilidade, atividade mitocondrial, integridade de acrossoma e a integridade da membrana plasmática, bem como a resistência térmica, demonstrando um efeito frequência-dependente.

Para avaliar o impacto do transporte em diferentes cenários de envio das doses, Paschoal *et al.* (2021) compararam os seguinte protocolos: doses com estabilização de 90 minutos a 22 °C mas que não foram submetidas a agitação (grupo controle), doses sem estabilização e agitadas por quatro horas a 22 °C e doses agitadas por quatro horas após 90 minutos em 22 °C e depois 60 minutos em 17 °C de estabilização. Neste estudo, os autores verificaram que houve efeito prejudicial do transporte para parâmetros de motilidade espermática e viabilidade de membrana plasmática. Outro estudo avaliando o impacto das vibrações emitidas no transporte, também observou um impacto na motilidade total e na viabilidade da membrana plasmática, mas não observou impacto em outros parâmetros avaliados, como integridade acrossomal e TTR (SEBASTIÁN-ABAD *et al.*, 2021).

Em um estudo avaliando 44 CPS do Canadá e Estados Unidos, com o total de 10.000 machos, verificou-se que 45% das centrais realizavam entrega própria das doses de sêmen, enquanto 36% usavam uma companhia de entrega independente e 27% outro tipo de entrega (incluindo companhias de entregas que não estavam relacionadas com a central) (KNOX *et al.*, 2008).

No Brasil, estima-se que 58% do transporte de doses inseminantes é feito em rodovias, em sistemas com controle de temperatura (15-18 °C) e 22,5% em caixas de isopor, sem sistema preciso de controle de temperatura. Além disso, a distância percorrida entre as CPS até a granja, pode ser superior a 600 km (BENNEMANN *et al.*, 2020). Esses dados demonstram a necessidade do desenvolvimento e aplicação de ferramentas de monitoramento do transporte,

para identificação de distâncias, condições de rodovias e até mesmo controle da temperatura, para implementação de estratégias que possam minimizar o estresse causado pela agitação proveniente do transporte.

### **3. ARTIGO**

ARTIGO A SER SUBMETIDO



## Dose-response effect of agitation time on sperm traits of boar semen diluted in short- and long-term extenders

### ABSTRACT

*Transport of extended boar semen doses is a common practice performed in swine industry, mainly due to the great use of artificial insemination in the world scenario. During transport, high vibrations emissions affect sperm quality parameters; however, little is known so far about the effect of long transport time under mild vibration. Therefore, this study aimed to verify the effect of agitation time regarding sperm parameters during storage in two semen extenders. One normospermic ejaculate from each boar (n=20) was diluted in a split sample design with LONG (Androstar® Plus) and SHORT (Beltsville Thawing Solution) extenders. Extended semen doses were filled in 60 mL tubes, with a total volume of 45 mL and 1.5 billion sperm cells. Extended semen doses were submitted to 0, 3, 6 and 12 h of agitation in an orbital shaker at 70 rpm. The samples were stored at 17 °C for 120 h. Sperm parameters were evaluated for sperm motility and plasma membrane integrity with SYBR-14/PI using the CASA system. Acrosomal defects under phase contrast microscopy, thermo-resistance test (TRT) at 38°C for 30 and 300 min, pH, oxidative stress status and mitochondrial membrane potential were also analyzed. The results showed that total and progressive motility were affected by the interaction between the agitation time and the extender, with a linear reduction as the agitation time increased for LONG extender ( $P < 0.02$ ). Semen doses diluted with SHORT showed higher pH ( $P < 0.01$ ) and the agitation time showed a positive quadratic effect with the highest pH observed in 6 h of agitation, for both extenders ( $P < 0.01$ ). An increase in the percentage of acrosome defects was observed with the use of SHORT extender ( $P < 0.03$ ). TTR, plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential were not affected by agitation time or interactions ( $P \geq 0.05$ ). Using SHORT extender, a negative quadratic effect was observed with increased agitation time ( $P = 0.01$ ) for oxidative stress status. This study has shown that long transport duration under mild vibration influence on boar extended semen doses quality. Furthermore, the use of a long-term extender seemed to fail in mitigate the effect of long transport time. The precise mechanism of transport duration in boar sperm traits remains to be elucidated.*

**Keywords:** Artificial insemination. Boar spermatozoa. Semen agitation. Semen quality. Shipping.

## Introduction

In the last decades, the use of artificial insemination (AI) has become into the most used biotechnology in pig reproduction (BORTOLOZZO *et al.*, 2015). Currently, around 90-100% of sows from the top ten pork-producing countries use this technique (WABERSKI *et al.*, 2019), due to the great benefits observed in fertility, genetic, labor, and herd health (KNOX, 2016). Sows are commonly inseminated with liquid preserved semen (RIESENBECK, 2011), with one of two types of semen doses (concerning the volume and number of cells): traditional AI, with transcervical deposition of 70-100 mL extended semen containing between  $1.5 - 2.5 \times 10^9$  sperm, and the intrauterine AI, with deposition into the uterine body of  $1 - 2 \times 10^9$  sperm in a volume between 30 and 50 mL (WABERSKI *et al.*, 2019).

According to the capability of promoting sperm viability over time, the boar semen extenders are divided into groups: short-term (up to three days) and long-term (more than four days) (YESTE; RODRÍGUEZ-GIL; BONET, 2017). It is common the use of a long-term extender, even using the semen dose for up to three days (LUCCA *et al.*, 2021), might due to an additional sperm protection during long-distance transportation (PINART *et al.*, 2015; WABERSKI *et al.*, 2019) and aiming to improve reproductive performance. However, no benefit has been observed compared to using short-term extenders (PINART *et al.*, 2015).

Furthermore, with the advance of AI, centralization of boar studs has become necessary to produce extended semen doses with strict and specialized quality control (SCHULZE *et al.*, 2017). In addition, the transport time and distance of shipping boar extended doses from boar studs to farms has increased. Although little research has focused on the transport of boar semen doses, it has been recently shown that vibration emission at 300 rpm (simulating a rough road surface) during 6 h impair boar sperm quality in frequency-dependent response. To assess the impact of transport in different semen doses shipping scenarios, Paschoal *et al.* (2021) compared: doses stabilized for 90 minutes at 22 °C but not subjected to vibration emission (control group), doses without stabilization and shaken for four hours at 22 °C and doses shaken for four hours after 90 minutes at 22°C and then 60 minutes at 17°C for stabilization. In this study, the authors found that there was a detrimental effect of transport on sperm motility parameters and plasma membrane viability.

The majority time of semen doses shipping are in good condition roads, with a short parts of rough roads. In the present study, it was hypothesized that a long exposure of semen doses to mild vibration emission (simulating a smooth road – 70 rpm) still compromise sperm quality, but the longer-term extender could mitigate this negative effect. Thus, we evaluated

the effect of vibration emissions on sperm quality after 0, 3, 6, and 12 hours of transport simulation using short- and long-term extenders, in a  $4 \times 2$  factorial design.

## **Material and Methods**

All procedures were conducted with approval from the Veterinary Research Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (COMPESQ-VET - UFRGS), project number 40611.

### *Animals and housing*

The animals were housed in a commercial boar stud located in Southern Brazil (Rio Grande do Sul State) and were collected routinely for semen doses production. All boars were housed in individual crates ( $0.7 \times 2.4$  m) with *ad libitum* access to water, and received 2.1-2.4 kg/d of the commercial corn-soybean meal diet (3.02 Mcal metabolizable energy/kg, 19.68% crude protein, and 1.07% total lysine). Ejaculates were collected from 20 mature boars (AGPIC337, Agroceres PIC<sup>®</sup>) aged  $17.6 \pm 5.78$  ( $\pm$ SD) months (range 11-48 months) and average interval of  $6 \pm 0.5$  days between collections.

### *Semen collection and processing*

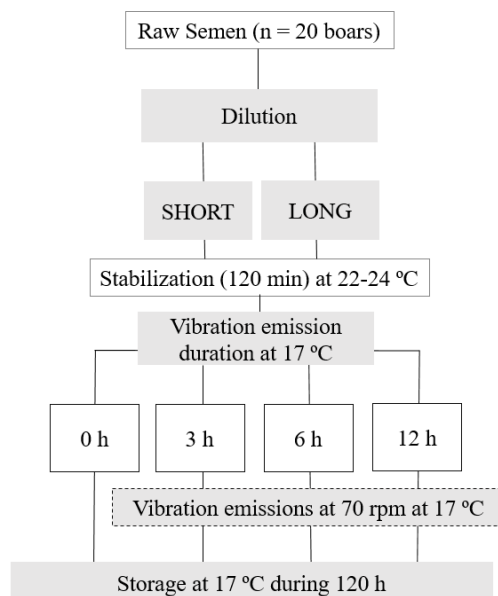
Ejaculates were collected using a semi-automatic system (BoarMatic, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) within a pre-warmed (38 °C) collection vessel. The pre-spermatic fraction was discarded, and the gel fraction was removed by filtration. Raw semen was weighed and evaluated for motility and concentration by using a computer-assisted semen analysis system (CASA) (Sperm Vision<sup>®</sup> Production Plus, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Only ejaculates with at least 70% total sperm motility and minimum of 80% morphologically normal spermatozoa were included in the study. Semen was diluted in a split sample design using long term (LONG - Androstar<sup>®</sup> Plus, Minitüb GmbH) and a short-term extender (SHORT - BTS, Minitüb GmbH). Intrauterine semen doses were produced with  $1.5 \times 10^9$  total spermatozoa and stored in 60 mL tubes (QuickTip Flexitube<sup>®</sup>, Minitüb GmbH). The filling volume was 45 mL and the amount of air within the doses was standardized at 15%, with adaptation in the height of the flexitube weld. At every time point of evaluation, a different new semen dose was used to avoid exposure to air. After processing, extended semen doses were transported to the laboratory in a temperature-controlled box (Klimabox für Ebersamen, Minitüb GmbH) at 22 °C for 120 minutes.

### *Experimental design*

The study had a  $4 \times 2$  factorial arrangement design, with two extenders (LONG and SHORT) and four levels of agitation time (0, 3, 6 and 12 h) as the factors studied (**Figure 1**).

### *Simulation of vibration emissions*

An orbital shaker was used for simulation of vibration emissions during transport of semen doses (NT165, Nova Técnica®, Piracicaba, Brazil), at a rotation speed of 70 rpm (amplitude 23 mm) in circular horizontal frequencies. The use of 70 rpm was established according to the amplitude value from the shaker used, equivalent to the 200-rpm in a study conducted by Schulze *et al.* (2018), with equation applied to move among orbital shakers with different orbit diameters to achieve similar OTRs (oxygen transfer rate) (BATES; PHILLIPS; O'BRYAN, 2016). Boar semen doses were placed horizontally on the shaker platform in a dark room at  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Once the vibration emissions were concluded for each treatment, the samples were stored in a temperature-controlled cabinet at  $17.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for up to 120 h. In treatments 0 h, extended semen doses were stored at  $17^\circ\text{C}$  soon after the arrival at the laboratory.



**Figure 1.** Schematic view of the experimental design. Each ejaculate from different boars ( $n = 20$ ) was diluted in a split sample design in SHORT and LONG extender. After the stabilization period (120 minutes) at  $22\text{-}24^\circ\text{C}$ , extended semen doses were agitated at  $17^\circ\text{C}$  in a dark room, according to the treatment (0, 3, 6 and 12 h). The 0-h treatment doses were stored in a temperature-controlled unit and were not submitted to agitation. After agitation, extended semen doses were stored in temperature-controlled unit at  $17^\circ\text{C}$  for up to 120 h.

### *Sperm motility analysis*

Sperm motility was assessed at 24, 72, and 120 h of storage with CASA system (AndroVision®, Minitüb GmbH), according to Menezes *et al.* (2020). An aliquot of 1.0 mL of extended semen was incubated for 20 min in a thermal block at  $37^\circ\text{C}$ . Then, a  $3\text{-}\mu\text{L}$  sample of

extended semen was placed by capillary flow in a chamber slide (Leja® 20 µm 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. For each sample, five consecutive fields in the central axis of a chamber were recorded at a frame rate of 60 pictures/s for 0.5 s. Software settings were adjusted for cell detection with a minimum head size of 15 µm and a maximum of 80 µm. Immotile cells were considered when sperm with ALH (amplitude of lateral head displacement) <1 µm and VCL (curvilinear velocity) <24 µm/s. Progressive motility was defined as VCL >48 µm/s and VSL (straight-line velocity) >10 µm/s.

#### *Sperm morphology and acrosome integrity analysis*

For sperm morphology analysis, samples of 25 µL of raw semen were fixed in 1 mL of pre-warmed (36°C) formalin-citrate solution (2.94%) and were classified as normal spermatozoa, abnormal head, acrosome defect, abnormal midpiece, attached proximal and distal cytoplasmatic droplets, folded tail and coiled tail (PURSEL; JOHNSON; SCHULMAN, 1972). Acrosome integrity was assessed during storage at 24, 72 and 120 h (PURSEL; JOHNSON; SCHULMAN, 1974). Samples of 200 µL of extended semen were fixed in 1 mL of formalin-citrate solution (2.94%) and were characterized according to acrosome integrity in normal or defective. Two hundred spermatozoa were evaluated under phase contrast microscopy at 1000× magnification (Olympus®, model BX41, Olympus Latin America Inc., Miami, USA).

#### *pH analysis*

The pH of extended semen doses were assessed with a digital pH-meter (K39-2014B, Kasvi®, São José dos Pinhais, Brazil) at room temperature (22°C) at 24, 72 and 120 h of storage. The pH-meter was previously calibrated with a neutral solution (pH = 7.00). The storage temperature of the doses was considered, and the electrode was washed with distilled water and wiped between samples.

#### *Plasma membrane integrity*

At 72 and 120 h of storage, the percentage of sperm cells with intact plasma membrane were analyzed, adapted from Menegat *et al.* (2017). A hundred microliters of extended semen were incubated in a thermal block at 37 °C, with 2.5 µL of a working solution containing the fluorochromes SYBR-14 and propidium iodide (LIVE/DEAD® Sperm Viability kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 10 min. The evaluation was performed with a CASA

system equipped with a viability module, using fluorescence microscopy (AxioScope.A1 HAL 100-FL, Filter Set 09, BP 450-490, Zeiss®, Germany) and at least 1000 sperm cells were counted. Software settings were adjusted for cell detection with a head size of 15-100  $\mu\text{m}$ . Color intensity was set for viable sperm (255 green and 0 red) and non-viable sperm (168 green and 255 red).

#### *Mitochondrial membrane potencial ( $\Delta\psi\text{m}$ )*

At 72 and 120 h of storage, sperm mitochondrial activity was analyzed, according to Gravance *et al.* (2000). A microplate was prepared with 200  $\mu\text{L}$  of each stored semen sample and 1  $\mu\text{L}$  of JC-1 (1.53 mM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to each well, incubating for 40 minutes at 37 °C. The emitted fluorescence was measured in a fluorescent microplate reader (SpectraMax ID3, Molecular Devices, San Jose, USA) at excitation of 485 nm, and emission of 532 nm (green) and 595 nm (orange).

#### *Oxidative stress status*

Sperm samples of extended semen were prepared for oxidative stress analysis, which was performed at 72 and 120 h of storage (MENEGAT *et al.*, 2017). One milliliter of semen dose was centrifuged for 2 min at 1500  $\times$  g, and the 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, the pellet was resuspended with the same solution added with DCFH-DA (Molecular Probes, Eugene, OR) at 100  $\mu\text{M}$ . DCFH-DA stain crosses cell membranes and hydrolyzes enzymatically by intracellular esterases in non-fluorescent 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 ID3, Molecular Devices, San Jose, USA) at excitation/emission of 485/532 nm after one hour of incubation at 38°C.

#### *Thermo-resistance test (TRT)*

The thermo-resistance test (TRT) was performed at 72 and 120 h of storage as described by Schulze *et al.* (2017). An aliquot of 10 mL of semen doses was incubated in a water bath at 38 °C under air access for up to 300 min. Sperm motility was assessed at 30 min and 300 min of incubation with the CASA system as previously described.

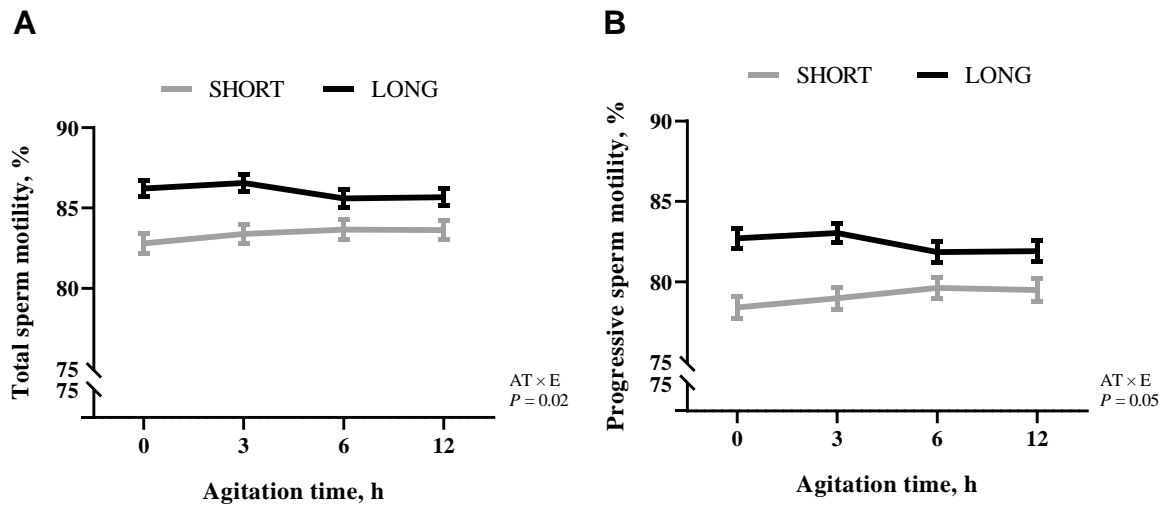
#### *Statistical Analysis*

The statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System software version 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Semen analysis at different time points (24, 72 and 120 h of storage) was analyzed as repeated measures, using generalized linear mixed models (GLIMMIX procedure), selecting the adequate covariance structure. The fixed effects included in the models were a time of agitation (0, 3, 6 and 12 h), type of extender (short and long-term extenders), time of storage (24, 72 and 120h), and their interactions; whereas boars and plate (for DCFH and mitochondrial potential assays only) were included as random effects.

Considering the quantitative levels of the time of agitation, polynomial orthogonal contrasts were used to determine the linear and quadratic effects, as well as of their interaction with extender and time of storage. The IML procedure of SAS was used to adjust linear and quadratic coefficients after accounting for unequally spaced treatments. Differences in linear or quadratic responses, among levels of one factor over the levels of the other factor, when interaction was significant, were investigated using the corresponding contrast coefficients for each pair of comparisons. The P-values of slope comparisons were obtained using the LSMESTIMATE statement. For the TRT, total and progressive motilities were analyzed as repeated measures, considering the incubation time (30 and 300 min), agitation time, and type of extender as fixed effects. The differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## Results

A significant linear interaction ( $P < 0.02$ ) between agitation time and extender was observed for total and progressive motility and the response pattern between the tested extenders was different for these variables (**Table 1; Figure 2**). While sperm motility remained constant throughout storage in extended semen in SHORT extender, a slight linear reduction was observed as the agitation time increased in LONG extender. There was a significant effect of the storage time of the semen doses ( $P < 0.01$ ), with a reduction for total and progressive motility from 120 h and 72 h of storage, respectively, but no interaction effect was observed between storage time and the time of agitation of the doses, or extender ( $P \geq 0.19$ ).



**Figure 2.** Effect of the interaction between agitation time (AT; 0, 3, 6 and 12 hours) and extender (E) (Long-term, LONG and short-term extender, SHORT) on total (A) and progressive (B) sperm motility of boar semen doses (n=20 boars). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (standard error mean).

The pH of semen doses had a positive quadratic effect ( $P < 0.01$ ; **Table 1**), with the highest value being observed after 6 h of agitation (7.17, 7.18, 7.21,  $7.19 \pm 0.02$ , for 0, 3, 6, 12 h, respectively). Lower pH was observed in LONG, compared to SHORT extender ( $7.13$  vs.  $7.25 \pm 0.02$ ;  $P < 0.01$ ), regardless of agitation time and storage time. Furthermore, pH increased throughout storage ( $7.06$ ,  $7.19$  and  $7.30 \pm 0.02$ , for 24, 72, 120 h;  $P < 0.01$ ). There was no evidence of a significant effect of double and triple interactions among the fixed effects ( $P > 0.15$ ).

For the percentage of cells with acrosome defects, there was a significant interaction between extender and storage time ( $P = 0.04$ ; **Table 1**). For LONG extender, there was an increase ( $P < 0.01$ ) in the percentage of acrosome defects from 24 h to 72 h of storage ( $0.83$  vs.  $1.05$ ,  $1.09 \pm 0.12\%$ , for 24, 72 and 120 h of storage, respectively). In SHORT extender, acrosome defects increased ( $P < 0.03$ ) throughout storage ( $1.40$  vs.  $1.59$  vs.  $1.93 \pm 0.12\%$ , for 24, 72 and 120 h of storage, respectively). Linear interaction between agitation time and storage time was also significant ( $P = 0.04$ ; **Figure 3**). At 120 h of storage, there was a linear increase in the percentage of acrosome defects as the agitation time increased. This response pattern differed from 24 h ( $P = 0.04$ ), where less fluctuation in acrosome defects was observed. Although the pattern at 72 h of storage was irregular, no difference was observed from 24 ( $P = 0.15$ ) or 120 h of storage ( $P = 0.30$ ). No significant effect of interaction between agitation time and extender was observed for the percentage of spermatozoa with acrosome defects ( $P = 0.53$ ).

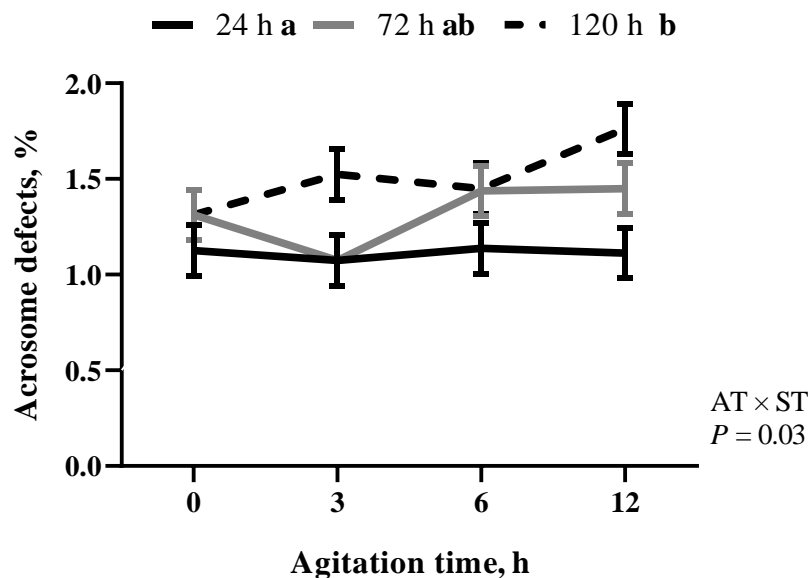


Total and progressive motility after TRT assessed at 72 and 120 h of storage reduced after 300 minutes of incubation ( $P < 0.01$ ; **Table 2**). There was a significant effect of extender ( $P < 0.01$ ), in which the total and progressive motility were greater for LONG than SHORT extender. However, there was no effect on agitation time or their interactions ( $P \geq 0.35$ ).

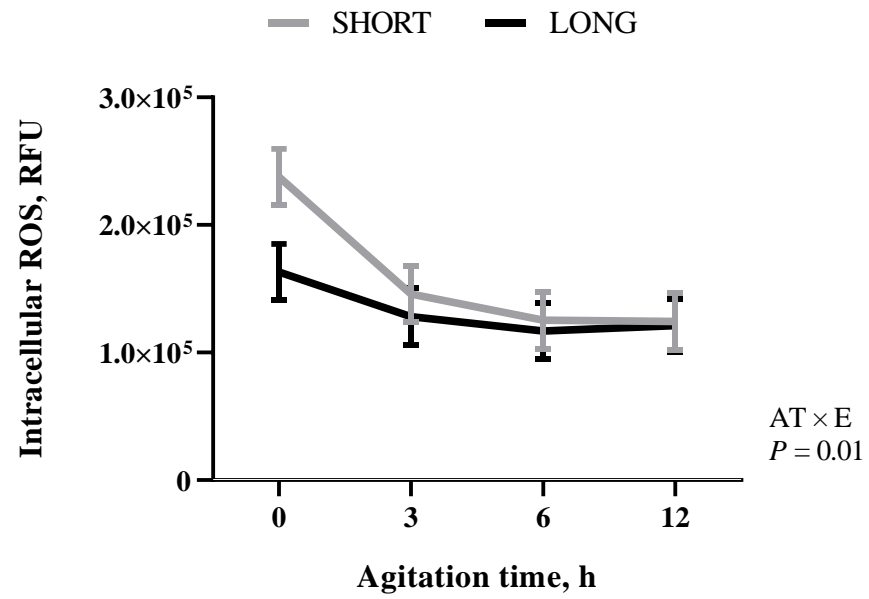
Membrane integrity was unaffected by agitation time, storage time, or the interactions ( $P \geq 0.07$ ). However, a higher percentage of cells with intact membrane was observed in LONG compared to the SHORT extender ( $67.1$  vs  $58.6 \pm 1.4\%$ ;  $P < 0.01$ ).

Oxidative stress was analyzed by measuring intracellular ROS and a significant quadratic interaction ( $P = 0.01$ ) between agitation time and extender was observed. In SHORT extender, it was found a quadratic decrease in DCF quantification as the agitation time increases, with lower values at 6 h of agitation; while in LONG extender, intracellular DCF quantification was less affected by the agitation time (**Figure 4**). No significant effect was observed for storage time ( $P = 0.52$ ), storage  $\times$  agitation time interaction ( $P = 0.78$ ), storage time  $\times$  extender interaction ( $P = 0.10$ ) or the 3-way interaction ( $P = 0.54$ ) for intracellular DCF.

Greater mitochondrial potential (orange fluorescence) was observed in the SHORT compared to the LONG extender ( $24501$  vs.  $22204 \pm 1914.45$  RFU;  $P < 0.01$ ). Mitochondrial membrane potential was unaffected by agitation time, storage time, or any interactions ( $P \geq 0.13$ ).



**Figure 3.** Effect by the interaction ( $P = 0.03$ ) between the agitation time (AT) (0, 3, 6 and 12 h) and storage time (ST) (24, 72 and 120 h) on acrosome defects of boar semen doses ( $n=20$  boars). Values are expressed as the means  $\pm$  SEM (standard error mean).



**Figure 4.** Comparison of slope responses regarding intracellular DCF quantification according to the interaction ( $P = 0.01$ ) between the agitation time (0, 3, 6 and 12 h) and extender (Long-term, LONG and short-term extender, SHORT) on boar semen doses ( $n=20$  boars). Values are expressed as the means  $\pm$  SEM (standard error mean). RFU = relative fluorescence units.

**Table 1.** Sperm parameters of boar semen doses according to storage time (24, 72 and 120 h), agitation time (0, 3, 6 and 12h) and extenders (SHORT and LONG) (n=20 boars).

Storage time	Extender	24 h				72 h				120 h				SEM	Effect
		0	3	6	12	0	3	6	12	0	3	6	12		
Total motility, %	SHORT	83.8	84.4	84.6	83.7	83.1	84.0	83.9	83.9	81.3	81.5	82.3	83.2	0.80	ST, E, VD <sub>lin</sub> × E
	LONG	86.9	87.5	86.2	86.8	86.4	87.3	86.3	85.5	85.2	84.6	84.3	84.5	0.70	
Progressive motility, %	SHORT	79.7	80.6	80.7	79.6	78.5	79.5	79.9	79.7	76.8	76.5	78.0	79.1	0.90	ST, E, VD <sub>lin</sub> × E
	LONG	83.5	84.3	82.6	83.6	82.7	83.7	82.6	81.4	81.7	80.8	80.3	80.4	0.80	
pH	SHORT	7.09	7.12	7.12	7.12	7.22	7.25	7.27	7.24	7.34	7.37	7.39	7.37	0.02	ST, E, VD <sub>quad</sub>
	LONG	7.00	6.99	7.00	7.02	7.12	7.12	7.15	7.13	7.22	7.23	7.26	7.21	0.02	
Acrosome defects, %	SHORT	1.60	1.27	1.32	1.37	1.57	1.30	1.77	1.70	1.72	2.00	1.80	2.20	0.16	ST, E, VD <sub>lin</sub>
	LONG	0.62	0.87	0.95	0.85	1.05	0.85	1.10	1.20	0.90	1.05	1.10	1.32	0.16	
Mitochondrial membrane potential (RFU)	SHORT	–	–	–	–	27367	25382	25063	24957	23078	23059	23008	24092	2859	E
	LONG	–	–	–	–	23058	22782	23391	19515	24909	21740	19504	22733	2859	

Values expressed as LSMeans ± SEM (Standard error mean).

SHORT: short-term extender; LONG: long-term extender.

Significant effect of storage time (ST), extender (E), agitation time (linear, VD<sub>lin</sub> or quadratic, VD<sub>quad</sub>), or the interactions were considered when  $P \leq 0.05$ .

**Table 2.** Sperm parameters of boar semen doses after thermoresistance test (TRT) at 38°C performed at 72 and 120 h of storage, according to incubation time (30 and 300 minutes), agitation time (0, 3, 6 and 12h) and extenders (SHORT and LONG) (n=20 boars).

Incubation time	Extender	30 minutes				300 minutes				SEM	Mean (E)	Effect <i>P</i> <0.05
		0	3	6	12	0	3	6	12			
<b><i>72 h of storage:</i></b>												
TRT total motility, %	SHORT	84.2	84.2	81.9	81.4	58.1	53.5	59.0	55.6	0.30	69.7	IT, E
	LONG	80.7	80.7	83.5	81.7	63.2	64.9	63.0	67.0	0.30	73.1	
	Mean (IT)	82.3				60.5						
TRT progressive motility, %	SHORT	75.4	74.9	76.2	75.9	45.9	40.5	46.7	44.0	0.40	59.9	IT, E
	LONG	79.3	79.8	78.8	77.0	52.5	54.0	51.8	57.0	0.40	66.3	
	Mean (IT)	77.1				49.7						
<b><i>120 h of storage:</i></b>												
TRT total motility, %	SHORT	79.0	79.6	78.9	80.0	59.2	54.3	57.3	59.1	0.30	68.4	IT, E
	LONG	81.7	82.4	82.1	81.0	62.8	63.1	61.4	64.4	0.30	72.4	
	Mean (IT)	80.6				60.2						
TRT progressive motility, %	SHORT	75.8	76.6	75.4	76.8	47.5	42.7	45.6	48.0	0.30	61.1	IT, E
	LONG	79.1	79.9	80.0	78.7	53.7	54.5	52.1	55.8	0.30	66.7	
	Mean (IT)	77.7				49.9						

Values expressed as LSMeans ± SEM (Standard error mean).

SHORT: short-term extender; LONG: long-term extender.

The effect of incubation time (IT), agitation time (linear, VD<sub>lin</sub> or quadratic, VD<sub>quad</sub>), and extender (E) or interactions were considered when *P* ≤ 0.05.

## Discussion

The swine industry routinely performs the transport of semen doses, especially after the centralization and professionalization of boar studs. A previous study has noted the importance of a negative effect of high vibration frequency on mitochondrial and membrane status of semen doses diluted in short-term extender after vibration emissions at 300 rpm during 6 h (SCHULZE *et al.*, 2018). However, little information is available regarding the effect of transport time on the quality of boar semen diluted in different extenders. Furthermore, long distances between boar studs and sow farms have been reported in Brazil, with some shipping over 600 km (BENNEMANN *et al.*, 2020). Thus, extended semen doses may take more than 10 h to be delivered at the farms. To compare the influence of transport duration in our study, boar ejaculates were diluted in short- and long-term extenders (SHORT vs. LONG), and semen doses were agitated for 0 (no agitation), 3, 6 and 12 h. In the present study, it was used a rotation speed of 70 rpm, equivalent to 200 rpm from Schulze *et al.* (2018), simulating a smooth road. Our findings suggested a negative impact of long agitation duration on sperm quality. However, despite the better results, the use of the long-term extender did not mitigate the effect of long transport duration.

External forces (e.g., transport vibrations) exerted on cells may change the cytoskeleton, depending on both magnitude and stress duration. Thus, damage to the cell membrane caused by some shear force has the ability to disrupt the structure and functionality of bilayer membrane receptors (HUA *et al.*, 1993). Although LONG extender showed highest values of total and progressive sperm motilities throughout storage, an interaction between agitation time and extender was observed, with a different response pattern between extenders. LONG extender showed a linear slight reduction as the agitation time increased, but total and progressive sperm motilities in SHORT extender remained constant. After the TRT challenge, the effect of agitation time on sperm motility was no longer present, but it was observed that samples incubated for 300 minutes exhibited lower sperm motilities at both storage time (72 and 120 h), when compared to 30 minutes of incubation. Previous studies reported contradictory results regarding TRT sperm motility. A significant lower motility was verified after TRT of 85-mL semen doses in BTS submitted to 300-rpm vibration emission for 6 h compared to non-agitated doses (24.3 vs. 69.7%; SCHULZE *et al.*, 2018). Contrarily, no effect of 6-h agitation at 300 rpm on sperm motility was verified after TRT of 50-mL doses in long-term extender (SEBASTIÁN-ABAD; LLAMAS-LÓPEZ; GARCÍA-VÁZQUEZ, 2021). Sperm thermo-resistance can be influenced by individual boar, age, stud, month, year, bacterial contamination,

dilution process, mitochondrial activity, conductivity of the water used for extender preparation, sperm concentration (SCHULZE *et al.*, 2019). In addition, volume and air entrapped into the dose could influence sperm thermo-resistance. However, the TRT is a importante test to be performed to simulate the ability of sperm cells to survive under sow physiological temperature (TARDIF *et al.*, 1999), detecting subtle levels of damage caused in the spermatozoa, which under routine tests might be undetected (FISER *et al.*, 1991). Further studies on boar semen doses transport are needed to assess the impact of the type of package, semen doses size, and the quantify of air inside the dose.

In the present study, the quadratic effect of agitation time demonstrated an increased pH (alkalinization) of up to 6 h of agitation for both extenders. Vibration emissions for 6 h at 300 rpm also resulted in medium alkalinization compared to non-agitated semen doses (SCHULZE *et al.*, 2018). These pH changes can be caused by the movement of extended semen doses and the generation of air bubbles and foaming. Foaming is detrimental to surface-active proteins, even though the shear involved is low (MAA; HSU, 1997). This pH rise could be explained by the loss of CO<sub>2</sub> from the liquid semen to the air within the tube, influencing the intracellular pH and consequently changing sperm metabolism and impairing sperm motility. In fact, a previous study reported that the presence of air within tubes (50% of the tube volume filled with extended semen) resulted in increased pH (7.52 vs. 7.07) and reduction of boar sperm motility from 72 h of storage, in comparison with doses without air (RIBEIRO *et al.*, 2016). In the present study, all semen doses were processed to have approximately 15% of residual air. Some researchers found a negative association between pH-rise and boar sperm motility; however, this negative effect is not always evident. Vyt *et al.* (2007) observed a reduction in sperm motility 0 h of storage in extended semen samples with 2/3 air. Boar semen doses homogenization during storage also increased pH, and the reduction of sperm motility was observed after TRT (SCHULZE *et al.*, 2015; MENEGAT *et al.*, 2017). On the other hand, Paschoal *et al.* (2021) did not observe pH oscillation (7.19 vs 7.19) when semen doses were agitated at 17 °C for 4 h at 200 rpm compared to non-agitated semen doses (equivalent to approximately 130 rpm to our study), respectively, but reduced sperm motility was found. Thus, pH variation could not be the primary mechanism related to diminished sperm motility. Although the long-term extender has not-open formula, the increased pH found in SHORT compared to LONG extender was expected. Modern extenders have more complex buffers to control pH, in addition to other components, maintaining sperm metabolism over storage (GADEA, 2003).

Oxidative stress is a critical factor that damages sperm due to an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defense, especially in boar spermatozoa. The high concentration of polyunsaturated fatty acids in the plasma membrane of boar spermatozoa serves as a potential substrate for ROS formation (CEROLINI *et al.*, 2000), and due to the restricted cytoplasmic space, only limited enzymatic protection can be offered (AITKEN *et al.*, 2014). ROS generation is responsible for impaired sperm motility due to the depletion of intracellular ATP levels (GUTHRIE; WELCH, 2006). Despite the similar mitochondrial membrane activity among agitation time treatments, we observed that intracellular DCF reduced as the agitation time increased in SHORT extender. This effect was contradictory to our hypothesis, since high values of DCF mean higher ROS content in the viable spermatozoa. This study assessed intracellular DCF content at 72 and 120 h, and the agitation-mediated ROS production might have occurred before assessments. Additionally, ROS lifespans are usually short (DE LAMIRANDE *et al.*, 1997), and it can be assumed that the ROS generation did not overcome the ROS scavenging at the evaluation time. In fact, the known effect of ROS on sperm traits, such as membrane disruption was not observed in the present study. Although high levels of ROS are notably detrimental to spermatozoa, low levels of ROS are involved in the physiological control of a range of mammalian sperm functions (PRADEEP; LALORAYA; LALORAYA, 1991; DE LAMIRANDE *et al.*, 1997). In a study performed by Yeste *et al.* (2013), boars were previously classified in good or bad freezability based on sperm motility, and the ROS generation was similar between classes of boars. The authors suggested that sperm cell can modulate its own intracellular ROS level. In addition, the idea that viable boar sperm may have sufficient antioxidants to scavenge ROS produced are also described (CEROLINI *et al.*, 2000).

A reduction on sperm membrane integrity was observed in extended semen doses agitated at 300 rpm for 6 h (SCHULZE *et al.*, 2018; SEBASTIÁN-ABAD; LLAMAS-LÓPEZ; GARCÍA-VÁZQUEZ, 2021), 200 rpm for 4 h (PASCHOAL *et al.*, 2021), but not when agitated at 100 rpm for 6h (SCHULZE *et al.*, 2018). In the study conducted by Paschoal *et al.* (2021), the authors reported similar mitochondrial membrane potential between non-agitated boar semen doses and those agitated at 17 or 22°C for 4 h. However, Schulze *et al.* (2018) observed a reduction in mitochondrial activity, who used a higher frequency of vibration emission (300 rpm) and showed a frequency-dependent negative response. Altogether, these findings suggested that the transport vibration simulated in the present study seemed mild to induce mitochondrial damage and oxidative stress or irreversible sperm damage. In the current study,

we tested the effect of agitation time with speed rotation of 70 rpm, since the long distances between boar studs and sow farm are traveled on roads in good condition, with short parts of rough roads. Thus, extended boar semen doses are submitted mainly to mild instead of strong vibration emission in regular shipping.

The superior difference observed in the plasma membrane integrity in long- compared to short-term boar semen extender was also previously observed (PASCHOAL *et al.*, 2021). As mentioned, some extender formulas are not open, but it is known that special components are added to extenders to prevent changes in the plasma membrane structure and function (LEVIS, 2000); thus long-term extenders contain improved membrane stabilizers, buffering agents, antioxidants, and antibiotics (KNOX, 2016). Under the agitation stress, it was expected that the long-term extender could mitigate the effect of long transport duration, which was not observed, suggesting a good ability to protect by short-term extender (SHORT). Further investigations need to consider using higher rotation speed to verify the protective effect of modern long-term extenders since some boar studs use these media when there is a transport challenge to enhance sperm protection in long-distance (WABERSKI *et al.* 2019). It is interesting to mention that SHORT demonstrated greater levels of mitochondrial membrane potential when compared to LONG extender. However, limited fluctuations may reflect normal physiological activity (ZOROVA *et al.*, 2018). Despite little information about the long-term formula, long-term extenders are known to preserve sperm motility and viability for the claimed period (VYT *et al.*, 2004). To neutralize metabolic wastes, buffering pH is required in extender formulas. When pH decreases, a reduction in the energetic metabolism is described (YESTE *et al.*, 2017) and it is suggested that lower levels of mitochondrial membrane potential found in our study could be associated with a metabolism reduction induced by long-term extender as a mechanism to preserve sperm cells for longer storage time.

## **Conclusion**

Extended semen quality parameters (motility, pH, acrosome defects, and oxidative stress status) were slightly affected by agitation time, but did not affect plasma membrane integrity, TRT sperm motility and mitochondrial membrane potential. Alternatives to minimize vibration stress should be developed, and concerning transport duration, logistic strategies might be helpful to shorten shipping time. Further researches are necessary to determine the mechanisms involved in transport stress on sperm traits.



## Conflict of interest

None of the authors declare any conflict of interest.

## Acknowledgment

The authors are grateful to Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul for providing the semen used in this study, Minitube for their partnership, and CAPES for financial support.

## References

- 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, n. 1, p. 17–27, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.120>
- BATES, M.; PHILLIPS, D.S.; O'BRYAN, J. Shaker agitation rate and orbit affect growth of cultured bacteria. **Thermo Fisher Scientific ANSHORBGRT**, v. 816, 2016.
- BENNEMANN, P. E. *et al.* Characterization of boar studs in Brazil. **Ciencia Rural**, v. 50, n. 11, p. 1–9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190998>
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* New Artificial Insemination Technologies for Swine. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, p. 80–84, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12544>
- CEROLINI, S. *et al.* Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1–2, p. 99–111, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00035-4)
- DE LAMIRANDE, E. *et al.* Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.
- FISER, P. S. *et al.* New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 28, n. 5, p. 454–459, 1991. Available at: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90054-R](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90054-R)
- GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17, 2003. Available at: <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- GRAVANCE, C. *et al.* Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691–1703, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00308-3)

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, n. 8, p. 2089–2100, 2006. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas.2005-766>

HUA, J. *et al.* A Review of the Effects of Shear and Interfacial Phenomena on Cell Viability. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 305–328, 1993. Available at: <https://doi.org/10.3109/07388559309075700>

KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 83–93, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION**. 4., Beltsville, Maryland USA. Proceedings. Lawrence : Allen, 2000. p.121-128.

LUCCA, M. S. *et al.* Effects of the classification of boars according to progressive sperm motility and the extender type on the reproductive performance of a single fixed-time insemination. **Theriogenology**, v. 161, p. 120–125, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.018>

MAA, Y. F.; HSU, C. C. Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n. 6, p. 503–512, 1997. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970620\)54:6<503::AID-BIT1>3.0.CO;2-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970620)54:6<503::AID-BIT1>3.0.CO;2-)

MENEGAT, M. B. *et al.* Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 179, p. 67–79, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.003>

MENEZES, T. *et al.* Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in-vitro sperm quality and reduces bacterial load. **Theriogenology**, v. 149, p. 131-138, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.003>

PASCHOAL, A. F. *et al.* Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen. **Theriogenology**, v. 175, p. 54–60, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.033>

PINART, E. *et al.* Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2days of storage: Does the type of extender really matter? **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1428–1437, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.007>

PRADEEP, G.; LALORAYA, M.; LALORAYA, M. M. Superoxide radical level and superoxide dismutase activity changes in maturing mammalian spermatozoa. **Andrologia**, v. 23, n. 2, p. 171-175, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1991.tb02528.x>

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; SCHULMAN, L. L. Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa during in vitro Aging. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 113–116,

1974. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas1974.381113x>

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; SCHULMAN, L. L. Interaction of Extender Composition and Incubation Period on Cold Shock Susceptibility of Boar Spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 3, p. 580–584, 1972. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas1972.353580x>

RIBEIRO, C. D. V. *et al.* The Influence of Air Contact on the Quality of Extended Boar Semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 7, 2016. Available at: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81300>

RIESENBECK, A. Review on International Trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. SUPPL. 2, p. 1–3, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x>

SCHULZE, M. *et al.* Effect of vibration emissions during shipping of artificial insemination doses on boar semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 192, n. January, p. 328–334, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.035>

SCHULZE, M. *et al.* Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 182, n. May, p. 138–145, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.013>

SCHULZE, M. *et al.* Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 127, p. 15–20, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.022>

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of Boar Semen Doses During Storage Affects Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 684–687, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12532>

SEBASTIÁN-ABAD, B.; LLAMAS-LÓPEZ, P. J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A. Relevance of the Ejaculate Fraction and Dilution Method on Boar Sperm Quality during Processing and Conservation of Seminal Doses. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, p. 292, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/vetsci8120292>

TARDIF, S. *et al.* The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 447–459, 1999. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00142-9)

VYT, P. *et al.* Air contact influences the pH of extended porcine semen. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 42, n. 2, p. 218–220, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00733.x>

VYT, P. *et al.* Comparative Study on Five Different Commercial Extenders for Boar Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 1, p. 8–12, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x>

WABERSKI, D. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, v. 137, p. 2–7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 9, p. 802–813, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.22840>

YESTE M. *et al.* Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**. v. 79, p. 929-939, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.008>

ZOROVA, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial com doses de sêmen refrigeradas é consolidada na rotina da suinocultura. Com o avanço dessa biotécnica e necessidade de assegurar padrões estritos de qualidade, faz-se necessário atualizações constantes em centrais de processamento de sêmen. Com isso, o impacto gerado às doses inseminantes no transporte das centrais até as granjas, torna-se um ponto crítico e importante na preservação da qualidade seminal.

Apesar de estudos anteriores mostrarem efeitos da emissão de vibrações sobre os parâmetros de qualidade espermática, de maneira geral, ainda faltam informações básicas que auxiliem na tomada de decisões. Alguns fatores como: tempo (que abordamos no presente estudo), material da embalagem, tamanho e quantidade de ar presente nas doses e o impacto gerado nos parâmetros espermáticos ainda precisam ser elucidados.

O presente estudo foi realizado com um tamanho amostral de 20 animais, todos machos reprodutores suínos, em maturidade sexual e rotina de coletas semanais. De maneira geral, a motilidade espermática, pH, defeitos de acrossoma e estresse oxidativo foram afetados pelo tempo de agitação.

Este estudo representa, de ponto de vista prático, que cuidados devem ser adotados na rotina de transporte das doses inseminantes e pontos como: temperatura do transporte, armazenamento das doses e manutenção periódicas dos veículos devem ser levados em consideração, com objetivo de minimizar os impactos mecânicos causados pela emissão de vibrações nessa etapa.

## REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual (2021). Available at: <https://abpa-br.org/relatorios/>.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1071/RD9950659>
- ALKMIN, D. V. Central de IA em suínos: Uma análise prática do processo de produção de sêmen de alta qualidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 43, n. 2, p. 327–330, 2019.
- ALMEIDA, M. C. S. *et al.* Impact of isothermic and bithermic dilution on quality of chilled boar sperm. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 4, p. 903–909, 2015.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology Lab Corner\*: Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317–325, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x>
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5-17, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- ANGRIMANI, D. S. R. *et al.* Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 277–283, 2015.
- AWDA, B. J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M. M. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function I. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 553–561, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>
- BENNEMANN, P. E. *et al.* Characterization of boar studs in Brazil. **Ciencia Rural**, v. 50, n. 11, p. 1–9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190998>
- BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade Technologies used in the assessment of boar ejaculate to produce high quality semen doses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. Supl 1, p. 5–16, 2008.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* Inseminação artificial em suínos. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª edição, v., 2008.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* Exame do ejaculado. In: **Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada**. Suinocultura em ação, vol. 2 ed., v. cap. 7, 2005.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* New Artificial Insemination Technologies for Swine. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, p. 80–84, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12544>
- BRITO, L. F. C. *et al.* Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1507–1527, 2016. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>

BRIZ, M.; FÀBREGA, A. The Boar Spermatozoon. *In: BOAR REPRODUCTION*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 3–47. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8_1)

BROEKHUIJSE, M. L. W. J. *et al.* Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1473-1486.e1, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.040>

BROEKHUIJSE, M. L. W. J. *et al.* Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 3, p. 779–789, 2012. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311>

BUSSALLEU, E.; TORNER, E. Quality Improvement of Boar Seminal Doses. *In: BOAR REPRODUCTION*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 517–550. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8_10)

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93–99, 2008.

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

CELEGHINI, E. *et al.* Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479–488, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>

FISER, P. S. *et al.* New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 28, n. 5, p. 454–459, 1991. Available at: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90054-R](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90054-R)

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

FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 52, p. 67–78, 1997. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9602720>

FOXCROFT, G. R. *et al.* Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1324–1336, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.015>

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300–318, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>

- GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17, 2003. Available at: <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431–444, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.023>
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide 1. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 2, p. 276–284, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.2.276>
- GATTI, J. L. *et al.* External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 98, n. 2, p. 439–449, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980439>
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–457, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- GOLDBERG, A. M. G. *et al.* The impact of bacterial contamination of the ejaculate and extender on the quality of swine semen doses. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 5, p. 3095, 2017. Available at: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3095>
- GRAVANCE, C. *et al.* Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691–1703, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00308-3)
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700–1708, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.002>
- HANCOCK, J. L. THE MORPHOLOGY OF BOAR SPERMATOZOA. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 76, n. 3, p. 84–97, 1956. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x>
- JOHNSON, L. A. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 143–172, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- JUNG, M.; RÜDIGER, K.; SCHULZE, M. In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 20–24, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12533>
- JUONALA, T. *et al.* Relationship Between Semen Quality and Fertility in 106 AI-Boars. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 3–4, p. 155–158, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1998.tb01334.x>
- KHOSRAVI, F. *et al.* Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. **Andrologia**, v. 46, n. 1, p. 17–23, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1111/and.12034>



- KNOX, R. V. *et al.* An update on North American boar stud practices. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1202–1208, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.036>
- KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 83–93, 2016a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>
- KNOX, R. V. The physiology of sperm production and the reproductive management of boars for fertility. *In:* , 2016b, St. Louis Missouri. **Midwest Boar Stud Managers Conference**. St. Louis Missouri, 2016b. p. 1-19.
- KUMARESAN, A. *et al.* Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 1–2, p. 162–171, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.006>
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 17, n. 1, p. 74-82, 1976. Available at: <https://doi.org/10.1186/BF03547944>
- LUCCA, M. S. *et al.* Effects of the classification of boars according to progressive sperm motility and the extender type on the reproductive performance of a single fixed-time insemination. **Theriogenology**, v. 161, p. 120–125, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.018>
- MELLAGI A.P.G. *et al.* Atualizações na avaliação andrológica em suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.43, p 47-53, 2019.
- MENEGAT, M. B. *et al.* Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 179, p. 67–79, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.003>
- PASCHOAL, A. F. *et al.* Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen. **Theriogenology**, v. 175, p. 54–60, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.033>
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; SCHULMAN, L. L. Interaction of Extender Composition and Incubation Period on Cold Shock Susceptibility of Boar Spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 3, p. 580–584, 1972. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas1972.353580x>
- REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480–4486, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>
- RIESENBECK, A. *et al.* Quality Control of Boar Sperm Processing: Implications from European AI Centres and Two Spermatology Reference Laboratories. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 1–4, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12573>

- SCHULZE, M. *et al.* Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 430–437, 2015a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004>
- SCHULZE, M. *et al.* Effect of vibration emissions during shipping of artificial insemination doses on boar semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 192, n. January, p. 328–334, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.035>
- SCHULZE, M. *et al.* Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 127, p. 15–20, 2019a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.022>
- SCHULZE, M. *et al.* New trends in production management in European pig AI centers. **Theriogenology**, v. 137, p. 88–92, 2019b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.042>
- SCHULZE, M. *et al.* Theriogenology Temperature management during semen processing : Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. **Theriogenology**, v. 80, n. 9, p. 990–998, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.026>
- SCHULZE, M.; RÜDIGER, K. HACCP approaches to boar semen production. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, 2014.
- SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of Boar Semen Doses During Storage Affects Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 684–687, 2015b. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12532>
- SEBASTIÁN-ABAD, B.; LLAMAS-LÓPEZ, P. J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A. Relevance of the Ejaculate Fraction and Dilution Method on Boar Sperm Quality during Processing and Conservation of Seminal Doses. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, p. 292, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/vetsci8120292>
- SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. *In*: OXIDATIVE STRESS. Elsevier, 1985. p. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958–978, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- SUTOVSKY, P. New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 11–19, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12554>
- TARDIF, S. *et al.* The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 447–459, 1999. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00142-9)
- VYT, P. *et al.* Comparative Study on Five Different Commercial Extenders for Boar Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 1, p. 8–12, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x>

WABERSKI, D. Critical steps from semen collection to insemination. *In:* , 2009.  
**Proceedings of the annual meeting of EU-AI-Vets.**, 2009. p. 66–69.

WABERSKI, D. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, v. 137, p. 2–7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>

ZHANG, X. G. *et al.* Effects of Bovine Serum Albumin on Boar Sperm Quality During Liquid Storage at 17°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 263–269, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12481>