

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

**“IMPACTO DA DILUIÇÃO ISOTÉRMICA E BITÉRMICA SOBRE A
QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO”**

MARIA CLARA SILVA DE ALMEIDA

PORTO ALEGRE

2014

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

“IMPACTO DA DILUIÇÃO ISOTÉRMICA E BITÉRMICA SOBRE A QUALIDADE
DO SÊMEN SUÍNO”

Autor: Maria Clara Silva de Almeida

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução Animal

Orientador: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

PORTO ALEGRE

2014

Maria Clara Silva de Almeida

**IMPACTO DA DILUIÇÃO ISOTÉRMICA E BITÉRMICA SOBRE A QUALIDADE
DO SÊMEN SUÍNO**

Aprovado em 14 de Março de 2014.

APROVADO POR:

Fernando Pandolfo Bortolozzo
Orientador

Ender Oberst
Membro da Comissão

Ana Paula G. Mellagi
Membro da Comissão

Paulo E. Bennemann
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A minha família, base da minha vida. Obrigada por não medirem esforços para que eu consiga alcançar os meus objetivos. Amo muito vocês! A minha mãe Cláudia, por acreditar em mim e em minhas escolhas, me apoiando independente dos resultados, sempre com uma palavra positiva. Ao meu avô José, pela confiança e por ser meu exemplo. Ao meu tio Flávio, minha tia Ana e minha prima Luísa pelas palavras de compreensão e sempre carinhosas. Minha avó Elza e a minha tia Cristiana pelo incentivo.

Aos amigos de Belo Horizonte, mesmo longe não deixaram de se preocupar e me querer sempre por perto. Mostrando que a amizade verdadeira vale a pena e independe da distância.

Ao meu orientador, Prof. Fernando P. Bortolozzo, pela paciência, ajuda, pelo ensinamento e pelo exemplo de ética. Aos meus co-orientadores, Prof. Ivo Wentz e Profa. Mari Lourdes Bernardi pelos ensinamentos compartilhados. Muito obrigada por permitirem que eu fizesse parte do Setor de Suínos!

A Júlia pela amizade e pelo comprometimento e auxílio, dando todo o suporte necessário para a produção dessa dissertação.

As minhas queridas companheiras de apartamento: Juliana, Lídia e Thaís, por me darem um lar em POA e fazerem de cada “hora do abraço” um momento de muito carinho e que recordarei para sempre.

Aos colegas e amigos da pós-graduação do Setor de Suínos que estiveram e estão ainda presentes, em especial: Karine, Thaís, Luíza e Cris, amigas mais que especiais e essenciais; Sato, Evandro, Diogo M. e Mateus, vocês me divertiram cada minuto. Aos colegas e amigos da graduação do Setor de Suínos, em especial as meninas Carine, Carol M., Caroline e Júlia P. Aprendi muito com todos vocês e o Setor não seria tão especial sem vocês!

Consegui muito mais que um mestrado em POA, tenho amigos verdadeiros que levarei no meu coração para sempre!

A Master Agroindustrial, principalmente a equipe da CPS, Daniele, Dionara e Marinês. Pela compreensão durante os atrasos na rotina da central e ajuda durante os meses do experimento. Pela amizade que foi criada, tornando as horas de trabalho mais tranquilas e divertidas.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

IMPACTO DA DILUIÇÃO ISOTÉRMICA E BITÉRMICA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO

Autor: Maria Clara Silva De Almeida

Orientador: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-orientadores: Prof. Ivo Wentz

Prof^ª. Mari Lourdes Bernardi

O uso de protocolos de diluição bitérmica está aumentando em centros de inseminação artificial e é necessário garantir que as doses de inseminação tenham a mesma qualidade quando comparado com protocolos de diluição isotérmica. Quatro ejaculados de cada 19 reprodutores PIC[®] foram coletados e distribuídos em *split sample* em três tratamentos: diluição bitérmica em duas etapas (T1), diluição isotérmica em duas etapas (T2) e diluição isotérmica em uma etapa (T3). A curva de temperatura para os três tratamentos foi feita utilizando um *data logger* com sensor de temperatura. As doses inseminantes foram preparadas utilizando o diluente BTS e armazenadas a 16°C e usadas para avaliação dos parâmetros espermáticos através do Sistema CASA e avaliação de morfologia espermática, durante 120 horas. A temperatura das amostras de sêmen submetidas à diluição bitérmica em duas etapas alcançou 24,1°C durante 120 minutos, enquanto que as amostras submetidas à diluição isotérmica em uma ou duas etapas alcançou 26,8°C e 27,0°C, respectivamente. A motilidade total, a progressiva e BCF foram influenciadas ($P < 0,05$) pelo tempo de diluição, mas não pelo protocolo de diluição. A motilidade total e progressiva diminuiu com o tempo de armazenamento (91.0 ± 0.91 para 81.5 ± 1.08 % e 74.0 ± 2.48 para 60.4 ± 2.59 % de 24h para 120h, para MOT e PROG, respectivamente) enquanto BCF diferiu entre 24 e 120h (28.6 ± 0.76 e 27.3 ± 0.79 Hz). As seguintes características de motilidade não foram afetadas pelo protocolo de diluição e pelo tempo de armazenamento: DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB e ALH. Às 72 h de armazenamento, a morfologia espermática não diferiu entre os tratamentos ($P > 0.05$), apresentando uma média geral de 9.2 ± 0.36 defeitos totais. Concluindo, a diluição bitérmica torna o processo de produção de doses inseminantes mais rápido, pois demoraram menos tempo para alcançar a temperatura

próxima de armazenamento, sem comprometer a qualidade das doses inseminantes produzidas.

Palavras-chave: cachaço, choque térmico, diluição, sêmen, temperatura.

ABSTRACT

IMPACT OF ISOTHERMIC AND BITHERMIC DILUTION ON QUALITY OF CHILLED BOAR SPERM

Author: Maria Clara Silva De Almeida

Advisor: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-advisors: Prof. Ivo Wentz

Prof. Mari Lourdes Bernardi

The use of bithermic dilution protocols is increasing in artificial insemination centers, being necessary to guarantee that the quality of insemination doses remain the same when compared to isothermic dilution protocols. Four ejaculates from each one of 19 crossbreed PIC[®] boars were collected and assigned, in a split sample design, in to three treatments: two step bithermic dilution (T1), two step isothermic dilution (T2) and one step isothermic dilution (T3). Temperature curve for the three treatments was recorded using a temperature sensor data logger. Semen doses prepared with BTS extender were stored at 16°C and were used to evaluate sperm parameters through CASA system and sperm morphology, during 120 h. The temperature in semen samples submitted to a two-step bithermic dilution reached 24.1°C during 120 min, whereas one or two-step isothermic dilution samples reached 26.8°C and 27.0°C, respectively. Total motility, progressive motility and BCF were influenced ($P < 0.05$) by the storage time but not by the dilution procedure. Total and progressive motility reduced throughout the storage time (91.0 ± 0.91 to 81.5 ± 1.08 % and 74.0 ± 2.48 to 60.4 ± 2.59 % from 24h to 120h, for MOT and PROG respectively) whereas BCF differed between 24 and 120h (28.6 ± 0.76 and 27.3 ± 0.79 Hz). The following motility traits were neither affected by the dilution procedure nor by the time of storage: DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, and ALH. At 72 h of storage, sperm morphology was not different among treatments ($P > 0.05$), showing an overall mean of 9.2 ± 0.36 total defects. In conclusion, the bithermic dilution makes the process of artificial insemination doses production faster by taking less time to reach a temperature close to that of storage, without impairing semen quality.

Keywords: boar, cold shock, dilution, semen preservation, temperature

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no Artigo Científico	Página
Tabel 1 Percentages of total motile and progressive motile sperm cells, and beat cross frequency (BCF) of boar AI semen doses stored for 120 h, according to the dilution procedure before being stored at 16°C.	34
Tabel 2 Motility sperm traits of boar AI semen doses submitted to different dilution procedures before storage at 16°C.	35

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas no Artigo Científico	Página
Figure 1	36

Temperature of semen samples during processing up to 180 min. Curves demonstrate mean temperature changes in semen samples submitted to three different dilution procedures (n=3 each): Two-step bithermic dilution - first and second dilution with extender at 34°C and 23°C, respectively; Two-step isothermic dilution - both the first and second dilutions were performed with the extender at 34°C; One-step isothermic dilution - single dilution with the extender at 34°C. Minutes 0, 1 and 10 correspond to the temperature measurements in raw semen, final first dilution and final second dilution, respectively. After dilution, all samples were kept at room temperature (24°C) until 120 min and then placed at 17°C up to 180 min.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH – amplitude do movimento lateral da cabeça

BCF – frequência de batimento da cauda

BSA – albumina sérica bovina

BTS – Beltsville Thawing Solution

CASA – Computer-Assisted Semen Analysis

CPS – Central de Processamento de Sêmen

DI_s – Doses Inseminantes

EDTA – Etileno sodio diamino tetraacético

HEPES – *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2ethanesulfonic acid*

IA – Inseminação Artificial

LIN – Linearidade

STR – Retilíneo

VAP – Velocidade média percorrida

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade em linha reta

WHO – World Health Organization

WOB – Coeficiente de oscilação

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	13
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1-Produção de doses inseminantes.....	15
2.2-Análise do Sêmen.....	16
2.2.1-Avaliações Microscópicas.....	17
2.2.1.1-Motilidade.....	17
2.2.1.2-Concentração espermática.....	19
2.2.1.3-Morfologia Espermática.....	20
2.2.2-Processamento do ejaculado.....	21
2.2.2.1-Desafios para o processamento das DIs.....	22
2.3-Protocolos de diluição.....	24
2.4-Diluentes utilizados na produção de DIs.....	25
2.5-Armazenamento das DIs.....	26
3-ARTIGO.....	28
4-CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1-INTRODUÇÃO

A produção de suínos se tornou altamente competitiva e as granjas, para alcançar as exigências de mercado, incorporaram novas técnicas buscando melhores desempenhos reprodutivos e redução nos custos. A inseminação artificial (IA) é uma das técnicas que mudou o panorama reprodutivo da suinocultura e possibilitou expressar o melhor potencial genético dos animais (BENNEMANN, 2006; ROCA et al., 2011).

Inicialmente esta técnica foi introduzida na Rússia no começo do século XX. Entre 1926 e 1927, houve as primeiras tentativas por Ivanov e continuadas por Milavanov e colaboradores entre 1930 e 1936 (JOHNSON et al., 2000). Em 1931, a IA já era realizada em granjas na Rússia (LEVIS, 2000). A partir da década de 1990 houve um crescente desenvolvimento e uma melhora na eficiência, além de um aumento exponencial na utilização comercial (ROCA et al., 2006; WABERSKI, 2009). Atualmente, é utilizada em mais de 90% das granjas tecnificadas (GADEA, 2003; SCHULZE, 2013), alcançando, em países com alta produção de suínos, como a Suíça e Alemanha 95% e 98%, respectivamente (RIESENBECK, 2011).

A IA trouxe inúmeras vantagens para a produção de suínos quando comparada à monta natural. Entre elas estão a maior segurança sanitária, o descarte de ejaculados impróprios para uso, à redução de custos por fêmea inseminada, a maior evolução técnica da equipe e redução do número de reprodutores (BORTOLOZZO et al., 2005). Contudo, uma das maiores vantagens é a aceleração do melhoramento genético que potencializa o uso de reprodutores geneticamente superiores (GERRITS et al., 2005; ROCA et al., 2006) e agrega características desejáveis de carcaça. Entre essas características estão o maior rendimento de carne, o maior ganho de peso, padronizando os animais que irão para abate (CASTAGNA, 2002; BENNEMANN, 2006). Apesar dos vários benefícios, ainda existem fatores limitantes do programa de IA como a necessidade de mão de obra qualificada, remuneração diferenciada, estrutura laboratorial mínima e curto período de armazenamento das doses inseminantes (DIs) (BENNEMANN, 2006).

Dentro do programa de IA é necessário um padrão para se obter resultados reprodutivos eficientes (WABERSKI, 2009; BROEKHUIJSE et al., 2011a). Por esse motivo, houve um avanço e algumas tecnologias como diluente de longa duração (sete a dez dias) (GADEA, 2003), uso do Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) (AMANN & WABERSKI, 2014) e a deposição pós cervical associada a doses com

menor número de espermatozoides foram adotadas (GARCIA et al., 2007). Apesar de todos esses progressos, tem se dado pouca atenção e foco para a técnica de diluição durante o processamento do sêmen.

Normalmente, as Centrais de Processamento de Sêmen (CPS) com o objetivo de reduzir os riscos do choque térmico as normalmente, utilizam o protocolo de diluição isotérmica, com uma ou duas etapas (LÓPEZ RODRÍGUEZ et al, 2011; MAES et al., 2011). Mas já existem estudos que estão testando um terceiro protocolo, denominado diluição bitérmica em duas etapas, no qual, o diluente que será acrescentado na diluição final está a uma temperatura inferior que a utilizada nos protocolos padrões (PETRUNKINA et al., 2005; SCHULZE et al., 2013). Entretanto, não existem trabalhos que utilizam vários ejaculados por reprodutor e o mesmo ejaculado dividido para diferentes tratamentos comparando diluição isotérmica e bitérmica.

O presente trabalho comparou três diferentes protocolos de diluição do sêmen de reprodutores suínos. Sendo dois protocolos usando o diluente à 34°C, diluição isotérmica com um ou duas etapas e um terceiro protocolo usando o diluente à 34°C e à 23°C. O objetivo do estudo foi avaliar se a diluição bitérmica resulta em doses inseminantes com a mesma qualidade quando comparada a diluição isotérmica com um ou duas etapas.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Produção de doses inseminantes

A eficiência reprodutiva em uma granja tecnificada está diretamente correlacionada à fertilidade dos reprodutores (FOXCROFT et al., 2008). Devido à utilização de IA, o reprodutor exerce um grande impacto dentro do rebanho (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; FLOWERS, 2004a; FOXCROFT et al., 2008). Em média, nas CPS cada reprodutor produz de 51 a 150 bilhões de espermatozoides por semana, resultando em 21 a 40 doses (KNOX et al., 2008). Dessa forma, dependendo da frequência de coleta e do número de doses por estro por fêmea, um único reprodutor pode afetar o desempenho reprodutivo de numerosas fêmeas (FLOWERS, 2004a). Alguns fatores devem ser levados em consideração para calcular o número de doses produzidas e fêmeas inseminadas por macho, como a idade média do reprodutor (1 a 2 anos de idade) e a taxa de reposição desses animais nas CPS, que varia entre 20% a 70%, sendo as causas principais: o melhoramento genético e a baixa qualidade espermática (KNOX et al., 2008).

Nas últimas décadas houve um aumento exponencial do uso de sêmen resfriado (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013) e no número de DIs produzidas por hora nas CPS (WABERSKI, 2009). Isto gerou a necessidade de melhorar a qualidade das DIs e de existir um padrão dentro do programa das CPS com produção de alta qualidade, alta biossegurança e alto valor genético para obter resultados reprodutivos eficientes (WABERSKI, 2009; BROEKHUIJSE et al., 2011a). Tanto fatores relacionados ao macho quanto fatores externos podem determinar a qualidade das DIs. São várias as etapas de produção das DIs que podem ser comprometidas. Dentre elas estão à higienização do reprodutor, o processo de coleta, o encerramento da coleta e passagem do ejaculado da área suja para a área limpa, o processamento e envase do ejaculado, o armazenamento e transporte das DIs (BORTOLOZZO et al., 2005; BENNEMANN, 2006).

2.2-Análise do Sêmen

Após a coleta, os ejaculados são submetidos a várias análises e quando estiverem dentro de um padrão mínimo (motilidade acima de 70% e máximo de 20% de alterações morfológicas) são aprovados para a produção de DIs (FLOWERS, 1997; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2003; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006; FOXCROFT et al., 2008). Entretanto, 1% a 10% dos ejaculados são descartados por baixa motilidade, alterações morfológicas e contaminação bacteriana (KNOX et al., 2008). Diversos métodos de análise também são realizados a fim de avaliar o reprodutor, o ejaculado e a contaminação bacteriana do ejaculado e da dose (BORTOLOZZO et al., 2005). Contudo, a análise de rotina utilizada como parâmetro avaliador de todos os ejaculados na maioria das CPS é a motilidade espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; BROEKHUIJSE et al., 2011b).

A importância de se realizar a análise de sêmen está relacionada ao potencial de fertilidade de um reprodutor. Este potencial pode ser mensurado por meio da taxa de prenhez e do tamanho da leitegada, mas é altamente influenciado pela genética e pela qualidade das fêmeas inseminadas (FOXCROFT et al., 2008; FLOWERS, 2013). Além disso, demanda maior tempo e custos para se obter esses resultados *in vivo* (BERNARDI, 2008).

Assim, é essencial prever a potencial fertilidade desses animais com o objetivo de excluir os menos férteis e otimizar o uso dos reprodutores com alta fertilidade (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2003; FLOWERS, 2004a; FOXCROFT et al., 2008). Uma vez comprovada a fertilidade e conhecido o valor genético de um reprodutor, a disseminação de genes de grande interesse econômico no plantel, é considerada o ponto chave para a eficiência do sistema de produção, através do uso intensificado e direcionado desses animais (FOXCROFT et al., 2010).

Como uma alternativa para mensurar a fertilidade dos reprodutores, pode-se utilizar uma combinação de exame clínico dos reprodutores associado à avaliação *in vitro* do sêmen (macro e microscópicas) (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; FOXCROFT et al., 2008). Desse modo, associar testes *in vitro* com fertilidade a campo parece ser uma estratégia eficaz para determinar a capacidade de fertilização para a seleção de reprodutores em uma CPS (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2003; POPWELL & FLOWERS, 2004).

Não há apenas um tipo de análise *in vitro* que está fortemente associada à fertilidade *in vivo*, determinando com acurácia a potencial fertilidade de um reprodutor (BERNARDI, 2008; FOXCROFT et al., 2008). Dentro dessas análises, a de motilidade é a mais utilizada (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; BROEKHUIJSE et al., 2011b). De acordo com Broekhuijse et al. (2011b), os parâmetros analisados pelo sistema CASA podem ser relacionados com a fertilidade dos reprodutores. Contudo, deve ser levado em consideração o efeito do reprodutor e da linhagem genética analisada. Existem diferenças entre eles que não estão relacionadas com os métodos de análise do sêmen (BROEKHUIJSE et al., 2011b).

Avanços na análise do ejaculado tem sido feitos, como o uso de corantes fluorescentes ou compostos conjugados a corantes fluorescentes e citometria de fluxo. Estes avaliam atributos espermáticos (integridade da membrana, status do acrossoma, integridade da cromatina e função mitocondrial) de forma rápida e em um grande número de espermatozoides, auxiliando na avaliação do sêmen (BERNARDI, 2008; BOE HANSEN et al., 2008). Contudo, esses métodos não são simples e baratos para serem utilizados na rotina das CPS (BERNARDI, 2008). Dessa forma, as principais análises realizadas em CPS são as qualitativas e quantitativas do sêmen *in natura* para determinar se o ejaculado em questão é viável para processamento e então, estimar o número de DIs que serão produzidas (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2003; FOXCROFT et al., 2008)

Devem ser feitas avaliações macroscópicas, como volume, cor, odor e aspecto e avaliações microscópicas, incluindo motilidade, morfologia e determinação da concentração espermática (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2003; BENNEMANN, 2006, FOXCROFT et al., 2008).

2.2.1-Avaliações Microscópicas

2.2.1.1-Motilidade

A motilidade espermática é uma das mais importantes características seminais avaliadas e indica o percentual de espermatozoides que se movimentam, além de estar correlacionada com a viabilidade espermática (FLOWERS, 2004b; BERNARDI, 2008; BROEKHUIJSE et al., 2011a; FOXCROFT et al., 2008).

A análise de motilidade deve ser feita logo após a coleta para que o ejaculado seja liberado para processamento e produção das DIs (FLOWERS, 1997; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006). E em um segundo momento, após a diluição para confirmar se a motilidade continua satisfatória para ser usada na IA e em amostras que ficam armazenadas entre 15° e 18°C, por um ou mais dias (BORTOLOZZO et. al., 2005). Após a diluição e o armazenamento, é importante que as DIs mantenham mais de 70% de células móveis e, não haja uma diferença maior que 10% de motilidade entre o ejaculado *in natura* e pós-diluído (FLOWERS, 1997; FERREIRA et. al., 2005; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006)

A motilidade é um método de avaliação que pode ser realizado pela observação subjetiva dos espermatozoides, visto sob um microscópio ou por meio de medições mais objetivas e padronizadas, como o sistema computadorizado CASA (FOXCROFT et al., 2008; AMANN & WABERSKI, 2014). Este sistema analisa e mede através de imagens de um microscópio com contraste de fase e um computador os parâmetros de deslocamento dos espermatozoides, subdividindo-o de acordo com a direção (curvilíneo ou retilíneo) e com a velocidade (FLOWERS, 2004b; DIDION, 2008). Dentro dessa subdivisão, as variáveis mais utilizadas relacionadas ao movimento dos espermatozoides são: motilidade progressiva, motilidade total, velocidade curvilínea (VCL), amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), velocidade média percorrida (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilíneo (STR), linearidade (LIN) e coeficiente de oscilação (WOB) (GARCÍA HERREROS et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe do envolvimento destas variáveis com o processo de fecundação. Outras funções do sistema CASA envolvem a determinação da concentração do ejaculado e avaliação da morfologia espermática (DIDION, 2008).

O sistema CASA otimiza o exame do ejaculado, melhora a eficiência da produção e, conseqüentemente, a qualidade das DIs garantindo uma avaliação mais detalhada e precisa da motilidade (BROEKHUIJSE et al., 2011a; SCHULZE, 2013; AMANN & WABERSKI, 2014). A precisão do sistema CASA aumenta a probabilidade de detectar mudanças na motilidade espermática em relação ao sucesso de fecundação do ovócito (BROEKHUIJSE et al., 2011a). Entretanto, este tipo de avaliação exige um alto custo de investimento, funcionários qualificados e que a técnica seja realizada de forma padronizada (BROEKHUIJSE, et al., 2011a).

2.2.1.2-Concentração espermática

A concentração espermática é um parâmetro quantitativo que associado ao volume do ejaculado, determina o número total de espermatozoides existentes e, conseqüentemente, o número de doses possíveis a partir deste (MAES et al., 2011).

A determinação da concentração espermática deve ter alta acurácia e precisão objetivando uma produção uniforme de DIs. Essa uniformidade é fundamental, principalmente, quando o objetivo da CPS é reduzir o número de espermatozoides por dose (HANSEN et al., 2006). A imprecisão na determinação da concentração espermática pode resultar em um valor superestimado ou subestimado que podem levar a problemas reprodutivos e aumento do custo de produção (VIANNA et al., 2004). O valor superestimado, no qual, a concentração mensurada é maior que a concentração real do ejaculado, produz DIs com um menor número de espermatozoides podendo resultar em uma taxa de fecundação indesejada. Já a determinação subestimada, em que a concentração mensurada é menor que a concentração real, produz DIs com um excesso de espermatozoides, indicando uso pouco eficiente dos reprodutores de alto valor genético (HANSEN et al., 2002; CHRISTENSEN et al., 2004; VIANNA et al., 2004).

A concentração espermática pode ser determinada pela contagem direta do número de espermatozoides (câmara hemocitométrica e contagem eletrônica de partículas) ou pela contagem indireta (fotocolorimetria), que é feita por estimativa (BORTOLOZZO et al., 2005). O método de determinar a concentração espermática depende da viabilidade técnica e econômica de cada CPS (BORTOLOZZO et al., 2005).

A contagem direta feita em câmara hemocitométrica é considerada a técnica padrão ouro e é recomendada pela "World Health Organization" (WHO) (MAHMOUD et al., 1997; VIANNA et al., 2004; HANSEN et al., 2006). Contudo, demanda maior tempo e trabalho, não sendo empregada na rotina das CPS (HANSEN et al., 2006). O uso do espectrofotômetro (fotocolorimetria) é o método utilizado com mais frequência nas CPS (HANSEN et al., 2002) em que a leitura da concentração é feita através do grau de absorbância da luz no ejaculado. Como desvantagem, o espectrofotômetro tende a superestimar a concentração espermática e a curva de calibração não é válida para todos os reprodutores por diferenças individuais (VIANNA et al., 2004). A quantidade de partículas de gel ou resíduos de gotas citoplasmáticas e bactérias variam de acordo

com o reprodutor e a coleta resultando em uma imprecisão na determinação da concentração (HANSEN et al., 2002; CHRISTENSEN et al., 2004).

Nos últimos anos houve um aumento do uso de métodos mais rápidos e precisos como a contagem eletrônica de partículas (sistema CASA) (BORTOLOZZO et al., 2005; HANSEN et al., 2006; DIDION, 2008). A contagem eletrônica é uma ferramenta que visa melhorar o controle de qualidade nas CPS (HANSEN et al., 2002). Porém, a precisão e a acurácia deste método pode ser diminuída por uma homogeneização incorreta da amostra, por erros na técnica de pipetagem e imprecisão no preenchimento da câmara, necessitando de funcionários qualificados e treinados (AMANN & WABERSKI, 2014).

2.2.1.3-Morfologia Espermática

Assim como a motilidade, a morfologia é uma avaliação qualitativa das células espermáticas (BORTOLOZZO et al., 2005; BERNARDI, 2008) realizada com amostras de sêmen *in natura* ou de DIs armazenadas. As amostras podem ser obtidas através: de esfregação de espermatozoides em lâmina corados com eosina-nigrosina ou com azul de Trypan e Giemsa, ou de preparação úmida (amostra fixada de espermatozoides em formol citrato entre lâmina e lamínula) observado em microscópio com contraste de fase (FOXCROFT et al., 2008).

A morfologia avalia o reprodutor e deve ser realizado quando há introdução de jovens reprodutores a CPS, periodicamente (não ultrapassando período superior a 60 dias) em todos os reprodutores e quando houver suspeita de alterações morfológicas durante os exames de rotina (PURSEL et al., 1972; BORTOLOZZO et al., 2005). No exame são contadas 200 células espermáticas por amostra, no microscópico de contraste de fase, com aumento de 1000x e óleo de imersão. São considerados espermatozoides normais, com alterações de cabeça, de colo, de peça intermediária, presença de gota citoplasmática, defeito de cauda e de acrossoma. O exame para determinar o percentual de alterações espermáticas necessita de mão-de-obra especializada (BORTOLOZZO, et al. 2005).

A avaliação de morfologia tem como objetivo determinar se as células espermáticas se desenvolveram e maturaram corretamente e, conseqüentemente, se mantêm a capacidade de fertilização (GADEA, 2002). As alterações de morfologia

espermática podem ter origem na espermatogênese, na maturação espermática ou decorrente da manipulação incorreta do ejaculado (CORCUERA et al., 2002; FLOWERS, 2004b; BORTOLOZZO et al., 2005).

Os defeitos de cabeça (tamanho e formato) são raros, entretanto, a principal causa é de origem genética, podendo ser causados também de acordo com as condições ambientais (temperaturas elevadas e choque térmico). Essas células apresentam motilidade, mas acredita-se que tem dificuldade de se ligarem ao óvulo durante a fecundação. As alterações de acrossoma podem ser especificadas como: danificado, em destacamento e destacado (ausente) (FLOWERS, 2004b).

As alterações mais comuns estão relacionadas à cauda e à gota citoplasmática (WABERSKI et al., 1994; FLOWERS, 2004b). A maioria das alterações de cauda se refere a alterações genéticas durante o desenvolvimento da cauda, tornando-as dobradas. Enquanto que, existem alterações associadas a condições ambientais diversas como flutuação de temperatura, alterações de pH e/ou osmótica que geram caudas enroladas (FLOWERS, 2004b). A gota citoplasmática, durante a maturação do espermatozoide, migra da cabeça do espermatozoide em direção à cauda, até se desprender. Quando presente, a gota citoplasmática indica a imaturidade da célula espermática (FLOWERS, 2004b). A gota pode estar localizada próxima à cabeça, denominada gota proximal ou localizada na cauda, denominada gota distal (WABERSKI et al., 1994; FLOWERS, 2004b).

2.2.2-Processamento do ejaculado

Após serem feitas as avaliações macro e microscópicas do ejaculado pode-se dar início ao processamento, desde que o ejaculado atenda padrões exigidos: ter motilidade acima de 70% e alterações morfológicas inferiores a 20% (FERREIRA et al., 2005). Contudo, quando o sêmen é processado os espermatozoides passam por mudanças nas condições físico-químicas, que dependendo do grau em que ocorrem, podem resultar em efeitos negativos sobre a qualidade da DI (FERREIRA et al., 2005; WEITZE, 2012).

2.2.2.1-Desafios para o processamento das DIs

Durante o processamento do ejaculado e armazenamento das DIs existem três desafios principais: choque de diluição, choque térmico e envelhecimento das células durante o armazenamento (WEITZE, 2012).

Quanto menor o número de espermatozoides por DIs, menor a quantidade de plasma seminal e maior volume de diluente, resultando em choque de diluição. Ou seja, há alterações no metabolismo e no equilíbrio osmótico das células espermáticas que associados ao choque térmico aumentam ainda mais o estresse das células espermáticas pela menor quantidade de plasma seminal (WEITZE, 2012).

Althouse et al. (1998), estabeleceram 12°C como temperatura crítica de choque térmico para o espermatozoide suíno. Esses autores compararam amostras armazenadas à 12°C e à 17°C e detectaram menor motilidade espermática nas amostras armazenadas à 12°C. Contudo, essa temperatura, normalmente não é alcançada durante o processamento das DIs, pois a temperatura do laboratório é controlada, sendo mantida à 24°C e o armazenamento entre 16° e 18°C (FERREIRA et al., 2005; LÓPEZ et al., 2011). Em contraste, Weitze (2012), realizou um estudo no qual o sêmen diluído com diluentes de longa e curta duração passou por uma pré-incubação à 25°C durante 24 horas para depois ser armazenado à 10°C. Os resultados de motilidade e morfologia dos acrossomas demonstraram um efeito protetor da pré-incubação, pois esta etapa aumenta a resistência dos espermatozoides contra o choque de frio e que o diluente de longa duração possui uma proteção adicional quando comparados aos diluentes de curta duração.

O espermatozoide suíno é extremamente sensível a baixas temperaturas se comparado ao espermatozoide de outras espécies, como bovinos e equinos (ALTHOUSE et al., 1998; PETRUNKINA et al., 2005). A sensibilidade do espermatozoide suíno está relacionada principalmente a quedas rápidas na temperatura e resulta em diminuição do metabolismo, perda da motilidade e alteração da composição intracelular e da membrana (PURSEL et al., 1972; PARKS & LYNCH, 1992).

A porcentagem de colesterol na membrana pode afetar essa sensibilidade do espermatozoide suíno, pois há uma menor proporção de colesterol/fosfolipídeos (DE LEEUW et al., 1990; SCHULZE, 2013). O espermatozoide suíno possui menor porcentagem de fosfatidilcolina e maior porcentagem de fosfatidiletanolamina e esfingomielina na membrana plasmática, quando comparado ao espermatozoide do

bovino (JOHNSON et al., 2000; PETRUNKNINA, 2005). Quando há queda na temperatura há uma restrição no movimento lateral da membrana fosfolipídica levando a menor fluidez e separação das camadas lipídicas, nas quais as proteínas se agrupam (WATSON, 1996). A resistência aos danos causados por choque térmico parece ser maior em espécies que possuem como característica da membrana espermática alta saturação de radicais acilo fosfolipídeos ligados e a uma elevada proporção de esterol fosfolipídeo (PARKS & LYNCH, 1992). Com isso, aumenta a vulnerabilidade dessa célula ao choque térmico resultando em reorganização das partículas na membrana, alterando a permeabilidade da membrana, havendo um desequilíbrio iônico com perda de cátions e enzimas (DE LEEUW et al., 1990; KATZER et al., 2005; LÓPEZ RODRIGUEZ et al., 2011).

Durante o processamento das DIs a diminuição da temperatura deve ocorrer de forma contínua e gradual. Dessa forma, visa aumentar a resistência da membrana plasmática do espermatozoide contra o choque térmico e diminuir os danos às células espermáticas (JOHNSON et al., 2000; FERREIRA et al., 2005; WABERSKI, 2009). Contudo, mesmo um resfriamento moderado (10°C) pode alterar a membrana plasmática do espermatozoide, diminuindo sua capacidade fecundante (PETRUNKNINA et al., 2005).

As CPS têm de considerar a alta suscetibilidade dos espermatozoides suínos às condições adversas de temperatura para tentar minimizar os efeitos nocivos causados pelo choque térmico evitando comprometer a fertilidade das DIs armazenadas (SCHULZE, 2013).

De acordo com as condições e o período de armazenamento, os espermatozoides das DIs sofrem mudanças estruturais (alterações na mitocôndria, no acrossoma e na membrana plasmática) e funcionais (queda na motilidade) semelhantes ao envelhecimento natural das células (WABERSKI et al., 1994b; JOHNSON et al., 2000). Existe uma correlação negativa entre a idade do espermatozoide e a sua capacidade de fecundação (WABERSKI et al., 1994b). A redução na capacidade de fecundação do sêmen inicia após a ejaculação e é um processo gradual, quanto maior o período de armazenamento do sêmen menor sua capacidade fecundante (WABERSKI et al., 1994b; ANIL et al., 2004).

2.3-Protocolos de diluição

Normalmente, nas CPS são utilizados dois protocolos de diluição para produção de DIs:

- a) Protocolo da diluição isotérmica em apenas uma etapa, em que o ejaculado é diluído com um volume total de diluente a temperatura de 32°-34°C.
- b) Protocolo da diluição em duas etapas, o ejaculado é primeiramente diluído na proporção de 1:1 (uma parte de ejaculado: uma parte de diluente) na temperatura de 32°-34°C. Espera-se em torno de 10 – 15 minutos para estabilizar e inicia o segundo momento, acrescentando o diluente à temperatura de 32°-34°C (FERREIRA et al., 2005; WABERSKI, 2009; LÓPEZ RODRIGUEZ et al., 2011).

De acordo com Weitze (2012) o protocolo de diluição isotérmica tem a capacidade de reduzir os efeitos gerados pelo choque térmico. Isso seria possível através de um efeito de proteção e aclimação da célula espermática ao novo ambiente, havendo um efeito estabilizante sobre os espermatozoides (WABERSKI, 2009; LÓPEZ RODRIGUEZ et al., 2011; WEITZE, 2012).

Existem trabalhos que alteraram o segundo momento da técnica rotineira de diluição (PETRUNKINA et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2011; SCHULZE et al., 2013). A segunda etapa, ou seja, a diluição final ocorre com o diluente à temperatura próxima de 22°C. Petrunkina et al. (2005) não encontraram nenhuma alteração de membrana quando compararam a diluição bitérmica e a isotérmica. Assim como López Rodríguez et al. (2011) não observaram diferença significativa na qualidade seminal baseado nos parâmetros do sistema CASA, quando compararam os mesmos protocolos de diluição. Embora, Schulze et al. (2013) encontraram uma pequena diferença na motilidade e na integridade de membrana nos três primeiros dias de armazenamento, quando comparou diluição bitérmica e isotérmica.

O protocolo de diluição bitérmico em duas etapas tem vantagens como: facilitar o processamento do sêmen, pois apenas um volume pequeno de diluente precisa ser aquecido à 34°C para ser utilizado na diluição 1:1, gerando menos custo à produção; a queda de temperatura das DIs ocorre de forma mais rápida, alcançando a temperatura de armazenamento em menor tempo (16°- 18°C) (SCHULZE et al., 2013). A queda na temperatura aumenta a fluidez da membrana plasmática bacteriana associada a uma alteração na função celular e parada no crescimento e metabolismo bacteriano (ALTHOUSE & LU, 2005). Devido as medidas utilizadas no protocolo bitérmico de

diluição, as DIs permanecem menos tempo à temperatura ambiente do laboratório. Outro ponto positivo é a distribuição das DIs em menor tempo para as granjas comerciais tecnificadas (SCHULZE et al., 2013).

2.4-Diluentes utilizados na produção de DIs

Os diluentes utilizados na IA são acrescentados ao sêmen, tem a função de permitir que o espermatozoide se mantenha viável por três a cinco dias de armazenamento para que seja capaz de fecundar o ovócito, garantindo assim, resultados aceitáveis de fertilidade (WABERSKI et al., 1994; FLOWERS, 2004c; RIESENCK, 2011). Os diluentes possuem nutrientes para o metabolismo espermático, neutralizam resíduos metabólicos, estabilizam a membrana espermática, previnem à capacitação do espermatozoide, mantêm o equilíbrio osmótico e retardam o crescimento bacteriano durante o armazenamento (FLOWERS, 2004c).

Os diluentes possuem como principal fonte de energia a glicose, mas existem outras como a galactose, frutose, ribose e trealose não tão eficientes (LEVIS, 2000; KAMP et al., 2003). A glicose também tem papel de manter a osmolaridade do diluente entre 210 a 290 mOsm, pressão osmótica que é tolerada pelo espermatozoide suíno (JOHNSON et al. 2000; LEVIS, 2000; FERREIRA et al., 2005).

O pH do sêmen *in natura* varia entre 7,2 e 7,5, sendo levemente alcalino (JOHNSON et al., 2000; FERREIRA et al., 2005). A alteração do pH pode ocorrer pela produção de metabólitos como o ácido lático pelas células espermáticas e pelas bactérias. Durante o armazenamento das DIs as concentrações de ácido lático aumentam, diminuindo o pH e levando a queda da motilidade e do metabolismo dos espermatozoides (LEVIS, 2000). Para que o pH se mantenha dentro deste intervalo os diluentes são compostos por tampões que são os íons: bicarbonato de sódio, citrato de sódio e cloreto de potássio e os compostos orgânicos (HEPES) que evitam as oscilações de pH (JOHNSON et al., 2000; FERREIRA et al., 2005). O EDTA (Ácido etileno-diamino-tetracético) tem a função de prevenir ou retardar alterações na estrutura e função da membrana plasmática (JOHNSON et al., 2000; FERREIRA et al., 2005).

Antibióticos (gentamicina, neomicina, estreptomicina e penicilina) também fazem parte da composição dos diluentes com a função de inibir o crescimento bacteriano (JOHNSON et al., 2000; FERREIRA et al., 2005).

Os diluentes são divididos em de curta ou longa duração. Os diluentes de curta duração mantêm a motilidade espermática acima de 70% por até três dias de armazenamento (DUBÉ et al., 2004; VYT et al., 2004; AMBROGI et al., 2006). Apresentam como vantagem, baixo custo de produção e baixo preço de comercialização (LEVIS, 2000). O diluente de longa duração mantém a motilidade acima de 70% e a viabilidade dos espermatozoides durante sete a dez dias de armazenamento (DUBÉ et al., 2004; AMBROGI et al., 2006; SCHULZE et al., 2013). Estes diluente apresentam componentes como HEPES que são capazes de tolerar maiores oscilações de pH e estabilizantes de membrana como o BSA (albumina sérica bovina), que também estimula a motilidade espermática (JOHNSON et al., 2000; DUBÉ et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

Assim como o tempo de armazenamento o diluente utilizado pode influenciar os resultados obtidos dos diferentes protocolos de diluição. Os diluentes de longa duração parecem fornecer maior proteção contra os efeitos do choque térmico quando comparados aos diluentes de curta duração (SCHULZE et al., 2013).

2.5-Armazenamento das DIs

Normalmente as DIs podem ser armazenadas a 15°-18°C por até cinco dias antes do uso na IA dependendo do diluente utilizado (JOHNSON et al., 2000; PAULENZ et al., 2000).

A baixa temperatura de armazenamento (15°-18°C) tem a função de desacelerar os processos metabólicos, ocasionando um menor consumo de energia por parte do espermatozoide. Esse baixo consumo de energia visa prolongar a viabilidade destes e conseqüentemente, diminuir os danos causados a essas células (PAULENZ et al., 2000; ALTHOUSE et al., 1998; KATZER et al., 2005; WABERSKI, 2009; WEITZE, 2012). Além disso, a baixa temperatura de armazenamento diminui os danos causados aos espermatozoides permitindo que a distribuição das DIs para os produtores não altere a capacidade dos espermatozoides de fecundar o ovócito no trato genital feminino (BOE HANSEN et al., 2008).

É fundamental evitar flutuações da temperatura de armazenamento das DIs, principalmente, temperaturas inferiores a 15°C ou quedas bruscas de temperatura (JOHNSON et al., 2000; PAULENZ et a., 2000; KATZER et al., 2005; YOUNG et al., 2008). Quando essas quedas são superiores à 2°C, os espermatozoides reajustam o

próprio metabolismo visando se adaptar as mudanças do ambiente de armazenamento. Além disso, ocorre uma alteração na composição do diluente, que conseqüentemente, diminui a qualidade e a vida útil das DIs (YOUNG et al., 2008). Há aumento na ocorrência de defeitos de acrossoma e inibição da capacidade fecundante do espermatozoide (JOHNSON et al., 2000; KATZER et al., 2005; FERREIRA et al., 2005). Com isso, é recomendado o monitoramento diário da temperatura dentro da conservadora, seja através de data loggers computadorizados até simples termômetros que medem a temperatura máxima e a mínima (YOUNG et al., 2008).

Deve-se evitar também o armazenamento de DIs ainda aquecidas, para diminuir a chance de correr o choque térmico nas DIs, já que estas entrariam em contato com a temperatura mais baixa da conservadora. Outro efeito negativo seria sobre as DIs já armazenadas na conservadora pelo aumento da temperatura dentro da conservadora pela presença de DIs ainda aquecidas (YOUNG et al., 2008).

Além desses fatores relacionados à temperatura de armazenamento, os reprodutores podem apresentar variação no tempo de manutenção da motilidade, durante o armazenamento do sêmen. Existem reprodutores que tem a capacidade de manter a motilidade acima de 60% por um período maior, até cinco dias após coleta, enquanto outros apresentam uma queda na motilidade mais rápida, a partir do segundo dia pós-coleta (REIS et al., 2002).

3-ARTIGO

IMPACT OF ISOTHERMIC AND BITHERMIC DILUTION ON QUALITY OF CHILLED BOAR SPERM

Almeida, MCS¹; Moroni, JL¹; Bernardi, ML²; Wentz, I¹; Bortolozzo, FP¹

¹Setor de Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, Brazil.

²Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, Brazil.

Abstract

The use of bithermic dilution protocols is increasing in artificial insemination centres; therefore, it is necessary to guarantee that the quality of insemination doses remain the same when compared to isothermic dilution protocols. Four ejaculates from each of 19 crossbreed PIC[®] boars were collected and assigned, in a split sample design, in three treatments: two-step bithermic dilution, two-step isothermic dilution and one-step isothermic dilution. Temperature curves for the three treatments were recorded using a temperature sensor data logger. Semen doses were prepared with a BTS extender and stored at 16°C and then used to evaluate sperm parameters with CASA system and sperm morphology, for 120 h. The temperature in semen samples submitted to a two-step bithermic dilution reached 24.6°C after 120 min, whereas one or two-step isothermic dilution samples reached 26.4°C and 27.4°C, respectively. Total motility, progressive motility and BCF were influenced ($P < 0.05$) by the storage time but not by the dilution procedure. Total and progressive motility reduced throughout the storage time (91.0 ± 0.91 to 81.5 ± 1.08 % and 74.0 ± 2.48 to 60.4 ± 2.59 % from 24h to 120h, for MOT and PROG, respectively) whereas BCF differed between 24 and 120h (28.6 ± 0.76 and 27.3 ± 0.79 Hz). The following motility traits were neither affected by the dilution procedure nor by the time of storage: DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, and ALH. At 72 h of storage, sperm morphology was not different among treatments ($P > 0.05$), showing an overall mean of 9.2 ± 0.4 total defects. In conclusion, the bithermic dilution makes the production of artificial insemination doses faster by taking less time to reach a temperature close to that of storage, without impairing semen quality.

Keywords: boar, cold shock, dilution, semen preservation, temperature

Introduction

Swine artificial insemination (AI) has seen a significant increase and improvement in its efficiency since 1990 (Roca et al., 2006). One of the greatest advantages of this technique is to accelerate the genetic improvement with high genetic merit sires (Gerrits et al., 2005; Roca et al., 2006). In the majority of intensive pig production systems worldwide, AI is routinely applied with semen extended in a liquid state, and usually stored at 16°C up to 5 days (Johnson et al., 2000; Waberski, 2009).

For the efficient production of semen doses, an accurate assessment of sperm traits is indispensable throughout the process. Much progress has been made and some technologies like extender for long-term semen preservation (Johnson et al., 2000) and Computer-Assisted Semen Analysis - CASA (Amann and Waberski, 2014) are being used. The quality of semen doses assumes a greater importance considering the recent increase in the use of post-cervical semen deposition combined with sperm cell reduction (Garcia et al., 2007). However, despite all of the improvements concerning semen preservation, only a few attempts have focused on optimising the process of semen dilution.

With the purpose of reducing the risks of cold shock, isothermic dilution protocols, by one or two steps, are usually performed in AI centres (López Rodríguez et al., 2011). However, semen dilution at 20°C, compared to 32°C, did not affect the motility of sperm stored at 16°C (Petrunkina et al., 2005). A bithermic protocol, using the extender in a lower temperature for the last dilution, is being routinely used in some artificial insemination centres (Schulze et al., 2013). However, it is necessary to assure that a bithermic protocol provides semen doses with a similar quality to those obtained with standard protocols. Studies that evaluate dilution procedures for swine semen using bithermic protocols are scarce (Petrunkina et al., 2005; Lopez Rodríguez et al., 2011; Schulze et al., 2013).

The present study compared three different protocols of semen dilution, two using the extender at 34°C, with one- or two-step isothermic dilution and one, the bithermic two-step dilution protocol, using the extender at 34°C for the first dilution and at 23°C for the final dilution. The aim of the study was to evaluate whether bithermic

dilution provides semen doses with the same quality when compared to isothermic dilution with one or two steps.

Material and Methods

Animal and facilities

The study was performed in an AI station located in southern Brazil, in Santa Catarina State. Nineteen crossbreed PIC[®] boars (Pietran x Duroc x Large White x Landrace - Agroceres PIC, Patos de Minas, MG, Brazil) aged 8 to 24 months were used. Boars were housed in individual crates in the same barn. The boars had *ad libitum* access to water and were fed daily with 2.5 kg of a corn-soybean diet (15% crude protein, 0.55% digestible lysine and 3300 kcal metabolisable energy) formulated to meet their specific nutritional needs (NRC 2012). Room ventilation and temperature were controlled by an adiabatic ventilation system.

Boar sperm motility, analysed using the CASA system (Sperm Vision 3.7; Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), was recorded from four to six weeks before the beginning of the trial. Boars that fulfilled the minimum requirements of 70% of total motility, after three days of storage, and a maximum of 20% sperm defects were included in this study.

Semen collection

Four ejaculates from each boar were collected once a week on a routine basis at the AI station. Boars were collected by glove hand method into a pre-warmed cup (38°C) coated with a disposable plastic bag (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and covered with a filter which was used to remove the gel fraction. Immediately after collection, the raw semen was transferred to the laboratory.

Semen processing

Once in the laboratory with a controlled temperature (~24°C), the weight of each ejaculate was recorded, temperature was measured and an aliquot of the ejaculate was collected for further morphological evaluation. Motility score and concentration of the ejaculates were obtained using the CASA system. All raw ejaculates used in the trial fulfilled the following requirements: a) minimum total motility of 80%, and b) maximum of 20% of morphological abnormalities. Each ejaculate was diluted in BTS

(Beltsville Thawing Solution - BTS; Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and assigned, in a split sample design, to the following treatments:

Two-step bithermic dilution treatment: the ejaculate fraction was diluted in a 1:1 proportion, with one part of the ejaculate at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ and one part of the extender at $34 \pm 1^\circ\text{C}$. The second step for final dilution was performed ten minutes later using the extender at $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Two-step isothermic dilution treatment: the ejaculate fraction was diluted in 1:1 proportion, with one part of the ejaculate at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ and one part of the extender at $34 \pm 1^\circ\text{C}$. The second step for final dilution was performed ten minutes later using the extender at $34 \pm 1^\circ\text{C}$.

One-step isothermic dilution treatment: one dilution was performed using the ejaculate fraction at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ and the extender also at $34 \pm 1^\circ\text{C}$.

After dilution, semen doses were processed to contain 3×10^9 sperm cells in a final 80 mL volume, in sealed airtight plastic tubes (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Ninety minutes after the dilutions described above, semen doses from each experimental treatment were stored at 16°C in a semen storage unit (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) for 120 h, and were used to evaluate the sperm motility parameters, in addition to sperm morphology.

Semen analysis

Motility traits were evaluated using the CASA system at different moments. At 0 hour, an aliquot of raw semen was diluted in a 2mL microtube (Sarstedt[®], Nümbrecht, Germany), using an electronic mixing pipette. A dilution rate of 1:9 was used, with 90 μL of raw semen and 810 μL of BTS extender being pre-warmed at 34°C . Previously, the ejaculate in the collection bag was thoroughly homogenised by rotating it at least five times. This semen sample was stored on top of a warming plate at 38°C and was homogenised five times. From that sample, an aliquot of 3 μL was used to fill, in a single step and by capillary flow, one of four chambers of standardised slide depth of 20 μm - Leja-4 chambers (Leja, 4 chamber counting slides; Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, the Netherlands). Samples were individually analysed (one chamber filled, one sample analysed) by CASA, using eight fields per slide along the centre line, at 200x magnification. Both the microscope-warming stage and the Leja chamber were pre-warmed at 38°C . The analyses were accepted when the coefficient of variation per eight fields was lower than 15%. The other CASA evaluations for semen parameters were

performed at 45 min, 24, 48, 72 and 120 h after final dilution. In those cases, 1mL of each stored semen dose was collected and kept for 5 min in a thermo block on the top of a warming plate at 38°C. A 3µL subsample was collected and placed on a pre-warmed glass slide, completely covered and spread with a pre-warmed cover slip (18 x 18mm). To obtain CASA parameters, samples were analysed using a common starting position within each slide, at 200x magnification. To avoid incorrect estimation by CASA, particles such as droplets, spots and dirt, and sperm heads were identified and manually deleted by the operator. The mean of the four microscope fields was used for the analysis.

The following CASA semen parameters were assessed: DAP - Distance Average Path (µm); DCL - Distance Curved Line (µm); DSL - Distance Straight Line (µm), defined as the distance that the sperm cell travels in a straight line (µm) from the first frame to the last frame of the analysis; VAP - Velocity Average Path (µm/sec), defined as the average velocity over the smoothed cell path; VCL - Velocity Curved Line (µm/sec), defined as the average velocity measured over the actual point-to-point track followed by the cell; VSL - Velocity Straight Line (µm/sec), defined as the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track; STR - Straightness (VSL/VAP); LIN - Linearity (VSL/VCL); WOB - Wobble (VAP/VCL); ALH - Amplitude of Lateral Head Displacement (µm), defined as the maximum measured width of the head oscillation as the sperm cells swam; BCF - Beat Cross Frequency (Hz), defined as the frequency in which the actual track crossed the smoothed track in either direction; Motility percentage of sperm >2.5 µm AOC, where DSL is the distance that the sperm cell travels in a straight line (µm) from the first frame to the last frame of the analysis; and progressive forward motility (% sperm ≥ 4.5 µm AOC). Software settings recommended by Minitüb GmbH (Tiefenbach, Germany) for progressive motile cells were adjusted for the cut-off values of AOC. Settings were cell detection, with a minimum cell size of 20 µm and a maximum of 120 µm, and DSL <4.5mm for local cells.

The morphological evaluation of raw and stored semen at 72 h was performed under phase-contrast microscopy at 1000x magnification. Two hundred sperm cells were counted and classified according to sperm morphology: normal, acrosome defects, abnormal head, neck defects, attached proximal cytoplasmatic droplets, attached distal cytoplasmatic droplets, middle piece defects, bent tail and coiled tail (Pursel et al., 1972).

The temperature curve for the three treatments was recorded using a temperature sensor data logger (myPCProbe, Novus Electronics, Brazil) that features a USB interface for computer communication. The temperature curve was performed three times for each treatment. A temperature probe (Pt100, myPCProbe, Novus Electronics, Brazil) was placed in a central position of the semen mixing cylinder. Temperature was recorded every minute for a total of 180 min, starting with the record of the temperature in raw semen, before dilution. The raw semen and AI doses were kept at room temperature (24°C) until 120 min and then placed at 17°C up to 180 min.

Statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System software, version 9.2 (2005, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Variables concerning motility characteristics (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, Total Motility, Progressive Motility) were analysed as repeated measures using the MIXED procedure. The treatment, storage time and its interaction were included in the model as fixed effects whereas boars and day of semen collection were used as random effects. Comparisons of treatments (LSMEANS) were performed with the Tukey–Kramer test with a 5% probability level for statistical significance. Percentages of sperm abnormalities were evaluated using the NPAR1WAY procedure and comparisons among treatments were performed with the Kruskal-Wallis test.

Results

Total Motility and Progressive Motility of raw semen were $93.2\% \pm 0.39$ and $80.5\% \pm 0.81$, respectively. At 45 minutes after the final dilution, there was no difference among treatments ($P > 0.05$) in any of the CASA parameters. The variables Total Motility, Progressive Motility and BCF were influenced ($P < 0.05$) by the storage time but not by the dilution procedure (Table 1). Total Motility and Progressive Motility reduced throughout the storage time, whereas BCF values were different between 24 and 120 h.

Table 1. Percentages of total motile and progressive motile sperm cells, and beat cross frequency (BCF) of boar AI semen doses stored for 120 h, according to the dilution procedure before being stored at 16°C.

Variables	Two-step bithermic dilution	Two-step isothermic dilution	One-step isothermic dilution	Pooled SEM	Mean
Total motility, %					
24 h	91.3	91.1	90.8	0.99	91.0 ± 0.91a
48 h	89.6	88.9	88.0	1.07	88.8 ± 0.94b
72 h	87.0	85.3	85.4	1.20	85.9 ± 0.99c
120 h	83.0	81.5	80.1	1.42	81.5 ± 1.08d
Mean	87.7	86.7	86.1	1.03	
Progressive motility, %					
24 h	74.8	73.3	73.9	2.71	74.0 ± 2.48a
48 h	70.0	69.3	70.8	2.77	70.0 ± 2.50b
72 h	68.5	65.9	66.7	2.77	67.0 ± 2.50c
120 h	62.0	61.5	57.8	3.00	60.4 ± 2.59d
Mean	68.8	67.5	67.3	2.54	
BCF, Hz					
24 h	28.8	28.4	28.8	0.84	28.6 ± 0.76a
48 h	27.5	27.3	28.3	0.87	27.7 ± 0.78ab
72 h	27.9	27.7	28.0	0.84	27.9 ± 0.76ab
120 h	27.8	26.9	27.3	0.92	27.3 ± 0.79b
Mean	28.0	27.6	28.1	0.76	

Two-step bithermic dilution: The first step dilution consisted of one part of the ejaculate at 34 ± 1°C and one part of the extender at 34 ± 1°C. For the second step dilution, the extender was at 23 ± 1°C;

Two-step isothermic dilution: The first step dilution consisted of one part of the ejaculate at 34 ± 1°C and one part of the extender at 34 ± 1°C. For the second step dilution, the extender was at 34 ± 1°C;

One-step isothermic dilution: Only one dilution was performed using the ejaculate fraction at 34 ± 1°C and the extender at 34 ± 1°C.

a,b,c,d Values followed by different letters indicate significant differences among the storage moments (P<0.05).

The following motility traits were affected neither by the dilution procedure nor by the time of storage: DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, and ALH. Overall means for these motility sperm traits are shown in Table 2. At 72 h of storage, sperm morphology was not different among treatments ($P>0.05$), showing an overall mean of 9.2 ± 0.4 total defects, with the predominance of acrosome defects (2.8 ± 0.2) and coiled tails (2.7 ± 0.2).

Table 2. Motility sperm traits of boar AI semen doses submitted to different dilution procedures before storage at 16°C.

Motility traits	Two-step bithermic dilution	Two-step isothermic dilution	One-step isothermic dilution	Mean
DAP	25.4	25.1	25.6	25.4 ± 0.20
DCL	45.5	44.4	45.5	45.1 ± 0.37
DSL	16.9	16.7	17.1	16.9 ± 0.14
VAP	54.8	53.8	54.9	54.5 ± 0.45
VCL	97.5	95.2	97.5	96.7 ± 0.81
VSL	36.5	36.0	36.9	36.5 ± 0.32
LIN	0.38	0.38	0.38	0.38 ± 0.002
STR	0.66	0.66	0.67	0.66 ± 0.002
ALH	2.62	2.56	2.60	2.60 ± 0.02
WOB	0.56	0.56	0.56	0.56 ± 0.002

Two-step bithermic dilution: The first step dilution consisted of one part of the ejaculate at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ and one part of the extender at $34 \pm 1^\circ\text{C}$. For the second step dilution, the extender was at $23 \pm 1^\circ\text{C}$;

Two-step isothermic dilution: The first step dilution consisted of one part of the ejaculate at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ and one part of the extender at $34 \pm 1^\circ\text{C}$. For the second step dilution, the extender was at $34 \pm 1^\circ\text{C}$;

One-step isothermic dilution: Only one dilution was performed using the ejaculate fraction at $34 \pm 1^\circ\text{C}$ and the extender at $34 \pm 1^\circ\text{C}$.

Abbreviations: DAP - Distance Average Path (μm); DCL - Distance Curved Line (μm); DSL - Distance Straight Line (μm); VAP - Velocity Average Path ($\mu\text{m}/\text{sec}$); VCL - Velocity Curved Line ($\mu\text{m}/\text{sec}$); VSL - Velocity Straight Line ($\mu\text{m}/\text{sec}$); LIN - Linearity (VSL/VCL); STR - Straightness (VSL/VAP); ALH - Amplitude of Lateral Head Displacement (μm); WOB - Wobble (VAP/VCL).

Within 20 min, temperature decreased to 25.3°C in doses submitted to the bithermic dilution, whereas one and two-step isothermic curves reached 31.4°C and 33.1°C, respectively (Figure 1). Within 120 min, the temperature reached 24.6°C in two-step bithermic samples, whereas one and two-step isothermic samples reached 26.4°C and 27.4°C, respectively.

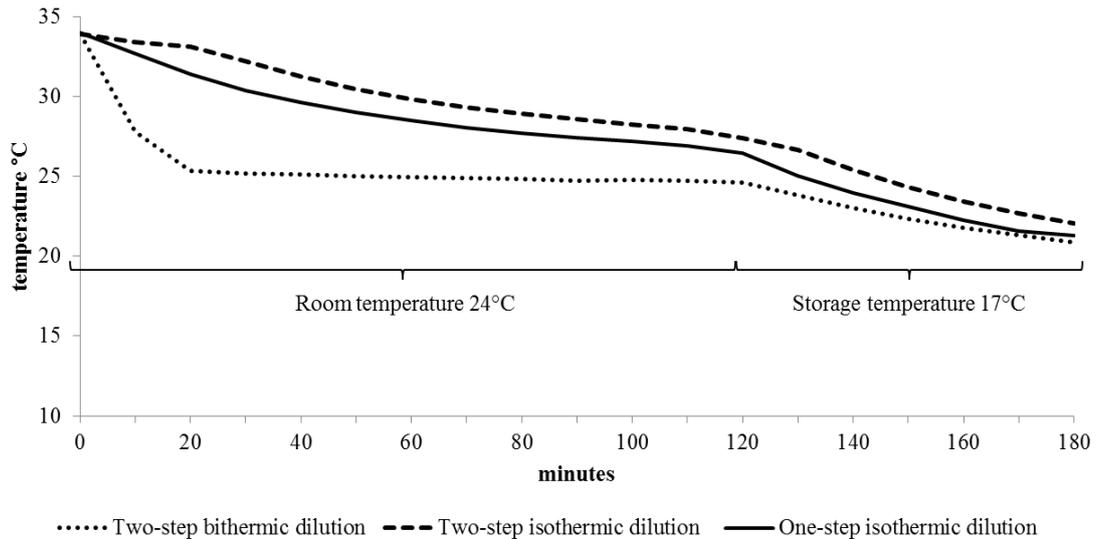


Figure 1. Temperature of semen samples during processing up to 180 min. Curves demonstrate mean temperature changes in semen samples submitted to three different dilution procedures (n=3 each): Two-step bithermic dilution - first and second dilution with extender at 34°C and 23°C, respectively; Two-step isothermic dilution - both the first and second dilutions were performed with the extender at 34°C; One-step isothermic dilution - single dilution with the extender at 34°C. Minutes 0, 1 and 10 correspond to the temperature measurements in raw semen, final first dilution and final second dilution, respectively. After dilution, all samples were kept at room temperature (24°C) until 120 min and then placed at 17°C up to 180 min.

Discussion

As boar sperm is extremely sensitive to low temperatures compared to spermatozoa from other species (Althouse et al., 1998; Petrunkina et al., 2005), a two-step isothermic dilution protocol is usually performed to prevent the effect of cold shock (Weitze, 2012). Cold shock reduces the number of viable spermatozoa, declines motility

and increases acrosomal defects, which affects spermatozoa function, reducing their fertilising potential (Althouse et al., 1998; Johnson et al., 2000). The 1:1 dilution with isothermic extender would provide a protective effect and adaptation of sperm cells; a slow and gradual temperature drop to the storage temperature at 15-17°C would result in less cell damage (Waberski, 2009; Weitze, 2012). However, in the present study, when comparing one-step isothermic dilution to two-step isothermic dilution, none of motility traits were negatively affected, indicating that the temperature of the extender at the first dilution was more important than the volume of the extender to be added. Although a great volume of extender needs to be heated to 34°C, this protocol has the advantage of the dilution being performed in only one step.

In a two-step procedure, bithermic dilution facilitates semen processing by reducing the time necessary to reach the desired storage temperature, when compared to isothermic dilution (Schulze et al., 2013). The fact that none of the CASA semen parameters differed between the isothermic and bithermic two-step dilution is in agreement with the results of previous studies (Petrunkina et al., 2005; Lopez Rodriguez et al., 2011). The results of VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR and LIN also corroborate those of Schulze et al. (2013). Nevertheless, Schulze et al. (2013) showed better results for total motility, progressive motility and integrity of sperm plasma and acrosomal membranes, in isothermic rather than bithermic dilutions, in addition to a small significant difference in WOB, on day 6 of storage. The fact that differences between isothermic and bithermic dilutions were small or absent on the first three days of storage led these authors to suggest that the lower temperature of the extender for the final dilution compromised only a small portion of sperm cells, but this difference increased during the storage time up to six days.

It can be pointed out that not only the storage time, but also the extender used could influence the results obtained with different dilution procedures. When semen was preserved in BTS, and the evaluations were performed for 2 days (Lopez Rodriguez et al., 2011) or 5 days (current study), the dilution procedure did not affect CASA sperm parameters. On the other hand, the adverse effects of two-step hypothermic dilution were more pronounced in BTS than in Androstar Plus, mainly with a longer storage time (Schulze et al., 2013). This suggests that the choice of extender could minimise the possible negative effect of a faster temperature decline resulting from a two-step bithermic dilution. Nevertheless, the scarcity of information concerning different

protective actions of semen extenders for bithermic dilution renders this aspect inconclusive, and further investigation is necessary for its elucidation.

The considerable individual variation among boars concerning the preservation capacity of semen quality during storage is well documented (Waberski et al., 1994; Reis et al., 2002). Due to its lipid membrane composition, swine sperm is particularly sensitive to cold shock, especially when submitted to temperatures below 15°C. The lipid phase transition can lead to the rupture of the plasmatic membrane, acrosome degeneration, and loss of ions and enzymes due to changes in membrane fluidity (DE Leeuw et al., 1991). Although the adverse effects of lipid phase transition are concentrated between 5-15°C (Watson, 2000), changes in membrane fluidity due to lipid phase transitions and protein reassembly may occur at temperatures above 20°C (Canvin & Buhr, 1989; Parks & Lynch, 1992). There is no concrete information about a possible difference among boars concerning the sensitivity to temperature variation during semen dilution but it may be possible that some boars are more sensitive to a two-step hypothermic dilution (Schulze et al., 2013). If this assumption is true, the group of boars used in each study could be a factor contributing to the discrepancy of results among studies. In the present study, although overall differences were observed among boars, they showed a similar response to all treatments (data not shown), suggesting that they were similarly tolerant to the dilution procedures studied. One of the positive aspects of this study is that it was performed with a relatively high number of boars. However, it is important to point out that before the beginning of the trial, all of the boars included in this study showed a satisfactory response in terms of motility during three days of semen storage. Thus, for the safe and widespread use of two-step bithermic or one-step isothermic dilutions, it would be interesting to validate these results with boars of unknown response to conventional semen preservation.

The use of bithermic instead of isothermic dilution has the advantage of facilitating semen processing, since it is necessary to heat only small volumes of extender used for the 1:1 dilution to 34°C (Schulze et al., 2013). We observed that bithermic dilution provides a faster drop in temperature to room temperature, making it possible to send semen doses in less time to commercial farms, as pointed out by Schulze et al. (2013). It must be also taken into account that spending less time at room temperature is beneficial because bacterial growth can be minimised (Althouse and Lu, 2005).

Conclusion

Semen quality during storage at 16°C in BTS extender is not affected by dilution performed in one or two steps when the temperature of the extender is kept at 34°C for both steps. When using a two-step dilution, the temperature of the extender can be reduced to 23°C for the second dilution without impairing semen quality, which enables room temperature to be reached faster.

Acknowledgements

We would like to thank Master Genética Animal, especially all staff from Master Carijos (Papanduva, Santa Catarina, Brazil), for their partnership and to Agrocere PIC and CNPq for their financial support of this project.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

Maria Clara S. Almeida is the student (MSc level) responsible for this project. She was helped during the experimental trial by Julia L. Moroni (Undergraduate Student). Prof. Mari Lourdes Bernardi provided help with the design of the study, statistical analysis and draft of the paper. Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo is the advisor and Prof. Ivo Wentz is the co-advisor; they contributed to the design of the study and the draft of the paper.

References

Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Pasrley M, 1998: Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* **50**, 535-543.

Althouse GC, Lu KG, 2005: Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* **63**, 573-584.

Amann RP, Waberski D, 2014: Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**, 5-17.

Broekhuijse MLWJ, Feitsma H, Gadella BM, 2011: Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci* **90**, 779-789.

Canvin AT, Buhr MM, 1989: Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *J Reprod Fertil* **85**, 533-540.

De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ, 1991: The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Domest Anim* **1**, 95-104.

Garcia JC, Abad M, Kirkwood RN, 2007: Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility. *Anim Reprod Sci* **100**, 397-401.

Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR, 2005: Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology* **63**, 283-299.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC, 2000: Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* **62**, 143-172.

Lopez Rodriguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soest A, Maes D, 2011: Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reprod Domest Anim* **47**, e63-e66.

Parks JE, Lynch DV, 1992: Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* **29**, 255-266.

Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyerbach M, Peterson ET, Waberski D, 2005: Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* **63**, 2278-2299.

Reis GR, Bernardi ML, Schwarz P, Bortolozzo FP, Wentz I, 2002: Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. *Acta Sci Vet* **30**, 159-166.

Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martínez EA, 2006: Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Domest Anim* **41**, 43-53.

Schulze M, Henning H, Rüdiger K, Wallner U, Waberski D, 2013: Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology* **80**, 990-998.

Waberski D, Meding S, Dirksen G, Weitze KF, Leiding C, Hahn R, 1994: Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim Reprod Sci* **36**, 145-151.

Waberski D, Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E, 2008: Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology* **70**, 1346-1351.

Waberski D, 2009: Critical steps from semen collection to insemination. **In:** Proceedings of the Annual Meeting of EU-AI-Vets, Ghent, Belgium, pp. 66-69.

Watson PF, 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 481-492.

Weitze KF, 2012: Novos conceitos na diluição do ejaculado suíno: Como as células espermáticas respondem aos desafios impostos? **In:** VII Simpósio Internacional de Suinocultura. Porto Alegre, RS, pp. 17-30.

4-CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial tem um papel fundamental na aceleração do melhoramento genético. Atualmente, com o avanço das tecnologias usadas tem-se conseguido informações mais detalhadas sobre o sêmen e as características dos espermatozoides. Dessa forma, permite-se explorar o processamento do sêmen e a produção de DIs com o objetivo de aprimorá-lo.

Este foi o primeiro trabalho a comparar três diferentes protocolos de diluição de um mesmo sêmen. Em uma CPS com uma alta produção de DIs, há utilização de um grande volume de diluente por dia. No protocolo padrão de diluição isotérmica do sêmen, o diluente deve ser aquecido a 34°C. Enquanto que, no protocolo de diluição bitérmica em duas etapas utiliza o maior volume de diluente à temperatura ambiente (23°C). Dessa forma, facilita o processamento de sêmen e torna a produção de DIs mais rápida.

A principal vantagem da utilização do protocolo bitérmico é que reduz a curva da temperatura das DIs. Como o diluente que será acrescentado ao ejaculado na segunda etapa da diluição está a 23°C, diminui o tempo para as DIs atingirem a temperatura próxima de armazenamento. Reduzida a curva de temperatura, a distribuição das DIs para serem utilizadas na IA das granjas tecnificadas ocorre em menor tempo.

Outra vantagem é que ele permite aquecer à 34°C apenas uma parte do diluente, o qual seria utilizado na primeira etapa da diluição. Com isso, diminuem-se os custos da produção de DIs, pois a energia gasta e o investimento para armazenamento e aquecimento de grandes volumes de diluente seriam reduzidos.

Este trabalho demonstrou que o processamento do sêmen utilizando a diluição bitérmica mantém a qualidade das DIs produzidas, sendo indicado para as CPS adotarem este protocolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTHOUSE, G. C.; WILSON, M. E.; KUSTER, C.; PASRLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 50, 535 – 543, 1998.

ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 573 – 584, 2005.

AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 5 – 17, 2014.

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

ANIL, S. S; LARRIESTRA, A.; DEEN, J.; MORRISON, R. B.; MINION, L. A retrospective study on the preserving capacity of a commercial boar semen extender. **Theriogenology**, v. 62, p. 425 – 436, 2004.

BENNEMANN, P. E. Como melhorar o desempenho produtivo pela inseminação artificial. **In:** V Seminário Internacional de Aves e Suínos – AveSui. Florianópolis, SC. p. 63-75, 2006.

BERNARDI, M. L. Tecnologias Aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de semen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 5 – 16, 2008.

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

BORTOLOZZO F. P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F. M.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L. Exame do ejaculado. **In:** BORTOLOZZO F. P., WENTZ, I.

Suinocultura em Ação: Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. p 69 – 90, 2005.

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

BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 779 –789, 2011b.

CASTAGNA, C. D. Considerações sobre programas de inseminação artificial e cistos ovarianos em suínos. **Dissertação de Doutorado**. Porto Alegre. 142p. 2002.

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

CORCUERA, B.; DE ALBA, C.; HERNÁNDEZ-GIL, R.; SAGÜES, A. Identifying abnormalities in boar semen. **Pig Progress**, v. 18, p. 24-27, 2002.

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

DUBÉ, C.; BEAULIEU, M.; REYES-MORENO, C.; GIULLEMETTE, C.; BAILEY, J. L. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**, v. 62, p. 874 – 886, 2014.

FERREIRA, F. M.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Processamento e armazenamento das doses inseminantes **In:** BORTOLOZZO, F. P. WENTZ, I. Inseminação Artificial na Suinocultura tecnificada. Suinocultura em Ação, p. 91 – 105, 2005.

FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 67 – 68, 1997.

FLOWERS, W. L. An Overview of Anatomy and Physiology of the Boar. **Midwest Boar Stud Conference II**, p. 6 – 14, 2004a.

FLOWERS, W. L. Detailed Description of Sperm Motility/Morphology and Causes of Abnormalities. **Midwest Boar Stud Conference II**, p. 15 – 22, 2004b.

FLOWERS W. L. Data on Various Extenders: Viability over Time. **Midwest Boar Stud Conference II**, p. 91 -96, 2004c.

FLOWERS, W. L. Triennial Reproduction Symposium: Sperm characteristics that limit success of fertilization. **Journal of Animal Science**, doi:10.2527/jas2012-5945, 2013.

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

FOXCROFT, G. R.; PATTERSON, J.; CAMERON, A.; DYCK, M. K. Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. **In: Proceedings of the 21st IPVS CONGRESS**, Vancouver, Canada. p. 25-29, 2010.

GADEA, J. Sperm under the microscope. **Pig Int**, v. 32, p. 24-27, 2002.

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

GARCÍA HERREROS, M.; APARICIO, I. M.; NÚÑEZ, I.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C.; P~ENA VEJA, F. J. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. **Theriogenology**, v. 63, p. 795 – 805, 2005.

GARCIA, J. C.; ABAD, M.; KIRKWOOD, R. N. Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 100, p. 397–401, 2007.

GERRITS, R. J.; LUNNEY, J. K.; JOHNSON, L. A.; PURSEL, V. G.; KRAELING, R. R.; ROHRER, G. A.; DOBRINSKY, J. R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, v. 63, p. 283 – 299, 2005.

HANSEN, C.; CHRISTENSEN, P.; STRYHN, H.; HEDEBOE, A. M.; RODE, M.; BOE-HANSEN, G. Validation of the FACSCount AF System for Determination of Sperm Concentration in Boar Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 330 – 334, 2002.

HANSEN, C.; VERMEIDEN, T.; VERMEIDEN, J. P. W.; SIMMET, C.; DAY, B. C.; FEITSMA, H. Comparison of FACSCount AF system, Improved Meubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVisio, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. **Theriogenology**, v. 66, p. 2188 – 2194, 2006.

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

KATZER, L. H.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5°C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. **Ciência Rural**, v. 35, p. 138 – 144, 2005.

KNOX, R.; LEVIS, D.; SAFRANSKI, T.; SINGLETON, W. An update on North American boar stud practices. **Theriogenology**, v. 70, p. 1202 – 1208, 2008.

LÓPEZ RODRÍGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN SOON, A.; MAES, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01938.x, 2011.

MAES, D.; LÓPEZ RODRÍGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P., VAN, S. A. Artificial insemination in pigs. **Artificial insemination in farm animals**, v. 1, p. 79 – 74, 2011.

MAHMOUD, A. M. A.; DEPOORTER, B.; PIENS, N.; COMHAIRE, F. H. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. **Fertility and Sterility**, v. 68, p. 340 – 345, 1997.

PAULENZ, H.; KOMMISRUDE, E.; HOFMO, P. O. Effect of LongTerm Storage at Different Temperatures on the Quality of Liquid Boar Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 24, p.72 – 76, 2000.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255 – 266, 1992.

PETRUNKINA, A. M.; VOLKER, G.; WEITZE, K. F.; BEYERBACH, M.; PETERSON, E. T.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, p. 2278 – 2299, 2005.

POPWELL, J. M.; FLOWERS, W. L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 97 – 113, 2004.

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

REIS, G. R.; BERNARDI, M. L.; SCHWARZ, P.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, p. 159-166, 2002.

RIESENBECK, A. Review on International Trade with Boar Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.1 – 3, 2011.

ROCA, J., VÁZQUEZ, J.M., GIL, M.A., CUELLO, C., PARRILLA, I., MARTÍNEZ, E.A.Challenges in Pig Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p. 43–53, 2006.

ROCA, J.; PARRILLA I.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Approaches Towards Efficient Use of Boar Semen in the Pig Industry. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.79 – 83, 2011.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory Semen assesment and Prediction of Fertility: still Utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 312 – 318, 2003.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. **Animal Reproduction**, v.10, p.268 – 276, 2013.

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

SCHULZE, M.; HENNING, H.; RÜDIGER, K.; WALLNER, U.; WABERSKI, D. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. **Theriogenology**, v. 80, p. 990 – 998, 2013.

VIANNA, W. L.; BRUNO, D. G.; NAMINDOME, A.; ROSSETO, A. C.; RODRIGUES, P. H. M.; PINESE, M. E.; MORETTI, A. S. Estudo Comparativo da Eficiência de Diferentes Técnicas de Mensuração da Concentração Espermática em Suínos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, p. 2054 – 2059, 2004.

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

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

WABERSKI, D.; WEITZE, K. F.; LIETMANN, C.; LUBBERT ZUR LAGE, W.; BORTOLOZZO, F.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v. 41, p. 1367–1377, 1994b.

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A. M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; Can external quality control improve pig AI efficiency? **Theriogenology**, v. 70, p. 1346 – 1351, 2008.

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

WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **In:** RATH, D., JOHNSON, L.A., WEITZE, K.F. Boar Semen Preservation III. Proc. 3rd Int. Conf. Boar Semen Preservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 31, p. 135–140, 1996.

WEITZE, K. F. Novos conceitos na diluição do ejaculado suíno: Como as células espermáticas respondem aos desafios impostos? **In:** VII Simpósio Internacional de Suinocultura. Porto Alegre, RS. p. 17- 30, 2012.

YOUNG, B.; DEWEY, C. E.; FRIENDSHIP, R. M. Prevalence and causes of inappropriate temperatures in on-farm semen storage units in Ontario. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, p. 92 – 95, 2008.