



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

**INDICADORES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA FERTILIDADE DE MACHOS
SUÍNOS QUE DIFEREM EM RELAÇÃO A RESISTÊNCIA AO
RESFRIAMENTO DAS DOSES DE SÊMEN**

MATHEUS SCHARDONG LUCCA

MATHEUS SCHARDONG LUCCA

2020



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

**INDICADORES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA FERTILIDADE DE MACHOS
SUÍNOS QUE DIFEREM EM RELAÇÃO A RESISTÊNCIA AO
RESFRIAMENTO DAS DOSES DE SÊMEN**

Autor: Matheus Schardong Lucca

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivo Wentz

COORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael R. Ulguim

PORTO ALEGRE

2020

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

CIP - Catalogação na Publicação

Lucca, Matheus Schardong
Indicadores in vitro e in vivo da fertilidade de machos suínos que diferem em relação a resistência ao resfriamento das doses de sêmen / Matheus Schardong
Lucca. -- 2020.
143 f.
Orientador: Ivo Wentz.

Coorientador: Rafael da Rosa Ulguim.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Espermatozoide. 2. Motilidade progressiva. 3. nascidos totais. 4. biomarcadores. I. Wentz, Ivo, orient. II. Ulguim, Rafael da Rosa, coorient. III. Título.

Matheus Schardong Lucca

Indicadores *in vitro* e *in vivo* da fertilidade de machos suínos que diferem em relação a resistência ao resfriamento das doses de sêmen

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim
Coorientador e Presidente da comissão

Prof. Dr. Ivan Bustamente-Filho – UNIVATES
Membro da comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini – UFRGS
Membro da comissão

Prof. Dr. Paulo Eduardo Bennemann – UNOESC
Membro da comissão

Porto Alegre, 14 de Fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A concretização desse trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Muito obrigado a todos aqueles citados e mesmo aqueles que não foram citados, mas sabem que contribuíram de alguma forma para minha formação pessoal e profissional; em especial agradeço:

- a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de cursar o curso de pós-graduação em uma instituição de referência, e pelo apoio estudantil, fundamental para que eu pudesse ter uma boa formação;

- ao Professor orientador, pela oportunidade de conduzir esta pesquisa;

- ao Professor coorientador, por sua orientação ao longo do processo. Aprendi muito e sou muito grato por todas as oportunidades que me foram oferecidas durante o tempo que passei no grupo de pesquisa.

- aos Professores, Fernando B., Ana Paula M., David B., pelo conhecimento transmitidos ao longo desses anos;

- aos colaboradores do Setor de Suínos, pela ajuda durante todo o curso;

- ao grande auxílio do Rafael G. que me acompanhou durante toda a execução dos experimentos;

- a minha família, por todo amor verdadeiro e principalmente pelo apoio dado para alcançar meus objetivos;

- a minha namorada, Tamine K., pessoa especial em minha vida, de quem o apoio foi fundamental, obrigado por tanto tempo de carinho, amizade e pelo companheirismo incondicional.

- aos meus amigos, Bruno M., Jamil F., Fernanda L., Aline P., pela convivência e companheirismo ao longo desse período;

- a Master agroindústria, por proporcionar a realização deste trabalho;

- a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

“Complications arose, ensued... were overcome”.

Captain Jack Sparrow

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fertilidade de reprodutores classificados como baixa ou alta preservação em diluentes de curta ou longa ação armazenados a 17°C através de indicadores de qualidade seminal e desempenho reprodutivo. Doze machos foram classificados em baixa (BP) ou alta preservação (AP) de acordo com sua capacidade de manter a motilidade progressiva no quinto dia em diluente de curta ação e armazenados a 17°C. As doses de sêmen foram avaliadas nos dias 1, 3, 5 e 10 após a diluição. A motilidade progressiva (MP) diferiu entre as classes de machos BP e AP durante o período de seleção ($P < 0,01$) e também após o período de seleção ($P < 0,01$). Para a motilidade total (MT), houve uma interação entre classe do macho e tempo de armazenamento ($P < 0,05$). Na MP, houve uma interação entre o diluente e o tempo de armazenamento ($P < 0,05$). No dia 10 de armazenamento, houve uma interação entre diluente e tempo de armazenamento ($P < 0,05$). Também houve efeito da classe de machos e do diluente para MT e MP ($P < 0,01$). Em avaliação de desempenho *in vivo*, um total de 519 porcas desmamadas foram inseminadas 24h após a indução da ovulação com triptorelina (IATF; OvuGel®). A taxa de prenhez (TP_r), taxa de parto (TP) e nascidos totais (NT) não foram afetados ($P > 0,05$) pela interação da classe do macho e diluente quando as IA foram realizadas com doses de 24h. No entanto, os machos BP apresentaram redução dos NT em relação aos machos AP ($P < 0,01$). Em um grupo de 397 porcas no qual foram realizadas inseminações com doses de 24 ou 72 h, foi observada uma interação ($P < 0,05$) entre a classe do macho e tempo de armazenamento para NT. A proteômica do plasma seminal (PS) de reprodutores AP e BP em um estudo adicional, onde foram identificadas 257 proteínas. Para ambas categorias de machos se observou 184 proteínas do PS semelhantes entre os grupos, porém, os machos BP e AP apresentaram 41 e 32 proteínas PS consideradas exclusivas, respectivamente. Dez proteínas foram expressas diferencialmente ($FC \geq 1,5$). Cinco proteínas (SPMI, ZBP1, FN1, HPX e C3) foram associadas aos machos AP e outras cinco proteínas (B2M, COL1A1, NKX3-2, MPZL1 e KRT1) foram associadas aos machos BP. Em um estudo aplicado, reprodutores suínos AP foram previamente classificados pela motilidade total e o desempenho desses machos com o uso de doses de até 7 dias foi avaliado em condições de campo. Nesse estudo, dois grupos experimentais foram formados com doses de sêmen armazenadas entre um e três dias, e outro com doses de sêmen armazenadas entre cinco e sete dias. O TP_r, a TP e os NT não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos. Em conclusão, os machos classificados como AP mantiveram os parâmetros de cinética e motilidade acima dos valores mínimos por 10 dias de armazenamento, independentemente do diluente utilizado. A classe BP demonstrou diminuição de NT. Além disso, os NT foram reduzidos quando uma única IATF usando doses de sêmen de machos de baixa preservação armazenadas por 72 h foi utilizada. Além disso, dez proteínas SP poderiam ser potenciais biomarcadores para preservação das doses de sêmen e indiretamente com a fertilidade. Ainda, em condições práticas de campo, o uso de doses de sêmen de machos selecionados pela capacidade de preservação quando diluídas em diluentes de longa ação e armazenadas por até sete dias não prejudicou o desempenho reprodutivo.

Palavras-chaves: Espermatozoide, Motilidade progressiva, nascidos totais, biomarcadores.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the fertility of boars classified as low and high-preservation diluted in short- or long-term extenders during storage at cooling at 17°C through indicators of seminal quality and reproductive performance. Twelve boars were classified in low (LP) or high preservation (HP) according to their capability in maintaining progressive motility in the fifth day in short-term extenders and stored at 17°C. The semen doses were evaluated on day 1, 3, 5 and 10 after dilution. Progressive motility (PM) differed between LP and HP boars during the selection period ($P < 0.01$) and also after the selection period ($P < 0.01$). In TM, there was an interaction between boar class and storage time ($P < 0.05$). In PM, there was an interaction between extender and time of storage ($P < 0.05$). At day 10 of storage, there was an effect of boar class and extender in TM and PM ($P < 0.01$). For the trial in vivo, a total of 519 weaned sows were single inseminated 24 h after ovulation induction with triptorelin (FTAI; OvuGel®). The pregnancy rate (PR), farrowing rate (FR), and the total number of piglets born (TPB) were not affected ($P > 0.05$) by the interaction of the boar class and extender when the AI were performed with semen doses at 24h. However, LP boars presented a reduction of TPB compared to HP boars ($P < 0.01$). In a group of 397 sows (storage time at insemination 24 or 72 h) it was observed an interaction ($P < 0.05$) between the class of boar and storage time for TPB. The proteomic was evaluated in seminal plasma of HP and LP boars, in which 257 proteins were identified. For both classes of boars, 184 similar SP proteins were observed. However, the class of boars LP and HP had 41 and 32 SP proteins considered exclusive, respectively. Among similar proteins, ten proteins were differentially expressed in the two groups ($FC \geq 1.5$). Five proteins (SPMI, ZPBP1, FN1, HPX, and C3) were associated with HP and the other five proteins (B2M, COL1A1, NKX3-2, MPZL1 and KRT1) were associated with LP boars. In an additional study, the boars were classified by total motility, only boars that were considered as HP were used. After, two groups were formed with semen doses stored between one and three days, and with semen doses stored between five and seven days. The PR, FR and TPB did not differ ($P > 0.05$) between the groups. In conclusion, the boars classified as HP maintained sperm motility and kinetics parameters above the minimum values for 10 days of storage regardless of the extender used. Besides that, single insemination of sows with semen doses with 72 h of storage from low-preservation boars reduced TPB. The LP boars had a reduced TPB. Also, 10 SP proteins could be potential biomarkers for boar semen preservation and indirectly with fertility. The use of semen doses diluted in long-term extender and stored for up to seven days did not impair the reproductive performance.

Keywords: Sperm, Progressive motility, total born, biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
AP	Alta preservação
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AND	Androstar Plus®
AQN	Família de proteína espermedesina composta por AQN-1 e AQN-3
AWN	Proteína espermedesina
BCF	Frequência com que o trajeto real cruza o trajeto médio
BTS	<i>Beltsville Thawing Solution</i>
BP	Baixa preservação
CASA	<i>Computer Assisted Semen Analysis</i>
CPS	Centrais de processamento de sêmen
DAP	Distância percorrida do trajeto médio
DCL	Distância percorrida do trajeto real
DI	Dose inseminante
DSL	Distância percorrida do trajeto em linha reta
GPX5	Glutathiona peroxidase 5
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
kDa	Quilo Dalton
LIN	Linearidade: relação entre VSL/VCL
mL	Mililitros
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
NT	Nascidos totais
OPN	Osteopontin
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSP	Proteína suína do plasma seminal
STR	Retilinearidade: relação entre VSL/VAP
TP	Taxa de parto
TPr	Taxa de prenhez
VAP	Velocidade percorrida do trajeto médio
VCL	Velocidade percorrida do trajeto real
VSL	Velocidade percorrida do trajeto em linha reta
WOB	Wobble: relação entre VAP/VCL, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas na revisão bibliográfica

- Figura 1.** Relações entre a concentração da dose inseminante e número de nascidos vivos de reprodutores comerciais selecionados..... 19
- Figura 2.** Média da taxa de prenhez e parto por reprodutor..... 20
- Figura 3.** Média de nascidos totais e nascidos vivos por reprodutor..... 21
- Figura 4.** Representação dos parâmetros de cinética espermática assessorada pelo *computer assisted semen analysis*..... 23
- Figura 5.** Representação da proteína *Carbohydrate-binding protein* AQN-3 da família das *spermadhesin*. 26

Figuras inseridas no manuscrito I

- Figura 1.** Motilidade progressiva de doses de sêmen diluídas em BTS de reprodutores classificados como alta e baixa preservação nas 120 h de armazenamento a 17 °C no período da seleção e pós-seleção dos reprodutores..... 56
- Figura 2.** Motilidade espermática total (A) e progressiva (B) de doses de sêmen dos machos classificados como alta e baixa preservação diluídas em diluentes de curta e longa ação durante 5 dias de armazenamento a 17 °C. 57
- Figura 3.** Motilidade espermática total (A) e progressiva (B) de doses de sêmen dos machos classificados como alta e baixa preservação diluídas em diluentes de curta e longa ação no dia 10 de armazenamento a 17 °C. 58

Figuras inseridas no manuscrito II

- Figure 1.** Description of the average (\pm SEM) of progressive sperm motility during the period of classification of the boars included in the study (A) and considering those boars selected according to the ranking of progressive motility at 120 h of storage (B) using the extender Beltsville Thawing Solution, Three semen collection once a week were performed to define the classes of low- and high-preservation boars. 82
- Figure 2.** Description of the average of progressive sperm motility at 120 h of storage in the extender Beltsville Thawing Solution during six

consecutive semen collection of twelve boars classified as low- or high-preservation, during the period of insemination of the sows.	83
Figure 3. Total piglets born of the classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses semen doses at 120 h of storage and considering the use of semen doses with 24 h or 72 h of storage for a single fixed-time insemination.	87
Supplement material. Total piglets born per boar into each class of boars defined as low- or high-preservation.	88

Figuras inseridas no manuscrito III

Figure 1. Total (A) and progressive (B) sperm motility of low- and high-preservation boars during 10 days of storage.	117
Figure 2. The average of farrowing rate (A), total piglets born (B), and piglets index (C) for low- and high-preservation boars to semen storage at 17°C. .	118
Figure 3. Venn diagram showing the distribution of identified proteins in low- and high-preservation boars to semen storage at 17°C.	119
Figure 4. Frequency distribution of proteins identified in seminal plasma of the boars classified as low- and high-preservation to semen storage at 17°C associated to (A) cellular component, (B) molecular function, (C) biological process and (D) reproductive process (level 2) using Blas2Go software.	120
Figure 5. Interaction analysis of seminal plasma proteins with fold change difference between high-preservation (A) and low-preservation boars (B) during storage time at 17°C generated with the STRING v.11 database program.	122

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas na revisão bibliográfica

Tabela 1. Descrições dos parâmetros de cinética espermática assessorada pelo <i>computer assisted semen analysis</i>	23
---	----

Tabelas inseridas no manuscrito I

Tabela 1. Características espermáticas de doses de sêmen dos machos classificados como alta e baixa preservação diluídas em diluentes de curta e longa ação durante o período de armazenamento a 17 °C.....	59
--	----

Tabelas inseridas no manuscrito II

Table 1. Sperm motility and reproductive performance of classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses at 120 h of storage and considering to extend the ejaculates in short- or long-term extenders for a single fixed-time insemination of weaned sows.	84
Table 2. Reproductive performance of the classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses at 120 h of storage and considering the use of different semen extenders in a protocol of a single fixed-time insemination for weaned sows.....	85
Table 3. Sperm motility and reproductive performance of the classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses and considering the use of short- or long-term extenders to produced the semen doses for use in single fixed-time insemination at 24 h or 72 h of storage.	86

Tabelas inseridas no manuscrito III

Table 1. Proteins differently expressed in the seminal plasma of the boars classified as low- and high-preservation to semen storage at 17°C with a fold change ≥ 1.5 among.....	121
--	-----

Tabelas inseridas no manuscrito IV

Table 1. Reproductive performance of sows inseminated with semen doses stored for different lengths of time (mean \pm SEM).....	133
--	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 Fertilidade do reprodutor suíno	17
1.2 Avaliação espermática	21
1.2.1 <i>Motilidade espermática</i>	22
1.2.2 <i>Morfologia espermática</i>	24
1.3 Marcadores proteicos do plasma seminal	25
1.4 Diluentes para uso em sêmen suíno	27
1.5 Resfriamento e armazenamento da dose inseminante	29
1.6 Inseminação artificial	30
1.6.1 <i>Intervalo ideal inseminação - ovulação</i>	32
CAPÍTULO II – PRIMEIRO MANUSCRITO	33
1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos	38
3. Resultados	43
4. Discussão.....	45
5. Conclusão	51
Referências	52
CAPÍTULO III – SEGUNDO MANUSCRITO	62
1. Introduction	64
2. Material and Methods	67
3. Results	72
4. Discussion	73
5. Conclusions	78
References	78
CAPÍTULO IV – TERCEIRO MANUSCRITO	89
1. Introduction	91
2. Material e Methods	93
3. Results	99
4. Discussion	102
5. Conclusions	110
References	111
CAPÍTULO V – QUARTO MANUSCRITO	123
1. Introduction	125
2. Materials and methods	126
3. Results	128
4. Discussion	129
5. Conclusion.....	131
References	131
CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
REFERÊNCIAS	137

INTRODUÇÃO

Para as centrais de processamento de sêmen, a relação entre a qualidade do sêmen e os resultados de fertilidade é um indicador importante a ser avaliado (BROEKHUIJSE *et al.*, 2011a). Mesmo considerando que as falhas de fertilidade possam ser causadas tanto pela fêmea quanto pelo macho (FLOWERS, 2013), o impacto no desempenho reprodutivo do rebanho é maior quando há problemas de fertilidade no reprodutor (SMITAL, 2009).

Uma das maneiras de verificar a fertilidade do reprodutor é através da avaliação rotineira dos ejaculados *in vitro*. Métodos clássicos de avaliação da qualidade espermática permitem ao examinador fazer uma declaração prévia sobre a qualidade do ejaculado, em apto ou inapto, para utilização em programas de inseminação artificial (IA) (BORTOLOZZO *et al.*, 2005b; KUMMER *et al.*, 2013). Contudo, estas avaliações não têm sido capazes de identificar os reprodutores subférteis (POPWELL & FLOWERS, 2004), mesmo utilizando novas tecnologias para avaliação seminal como o sistema CASA e a citometria de fluxo (FOXCROFT *et al.*, 2010). Dessa forma, a identificação de machos subférteis ainda é difícil devido à grande similaridade dos resultados de testes *in vitro* entre os reprodutores (KUMMER *et al.*, 2013).

Apesar do progresso nas análises seminais, Roca *et al.* (2015) estimam que 5 a 7% dos machos suínos são subférteis. Já Patterson *et al.* (2011) sugerem que 10 a 15% dos reprodutores no plantel, que satisfazem padrões normais para a qualidade do ejaculado, estariam classificados como subférteis. Portanto, para a identificação de reprodutores subférteis é necessária a realização de uma série de análises combinadas, de diversos parâmetros seminais, para possibilitar uma estimativa mais exata do potencial fecundante do sêmen (REIS *et al.*, 2002). Aliado a isso realizar avaliações *in vivo* com a utilização de baixa concentração espermática da dose (FOXCROFT *et al.*, 2010), doses homospérmicas e uma única inseminação por matriz podem proporcionar maiores desafios de fertilidade e auxiliar a identificação de machos subférteis.

O impacto da fertilidade de um doador de sêmen sobre o desempenho reprodutivo do plantel é alto (FOXCROFT *et al.*, 2008; SMITAL, 2009), portanto, a predição da fertilidade do reprodutor tem grande importância econômica para os rebanhos suínos quando a IA é utilizada (GADEA, 2005). Em condições

comerciais, os ejaculados são geralmente selecionados com base na motilidade total do ejaculado *in natura*, de modo que apenas aqueles com motilidade acima de um valor de referência são utilizados para a IA (KUMMER *et al.*, 2013).

Uma forma de determinar a fertilidade do reprodutor é através da avaliação da motilidade do sêmen diluído em diferentes tempos de armazenagem, ou seja, a sensibilidade dos espermatozoides ao longo do tempo de armazenamento pode indicar machos com melhor potencial de fertilidade *in vivo* (FOXCROFT *et al.*, 2008). Esse é um método fácil, rápido e barato, podendo servir para identificar reprodutores subfêrteis do plantel (JUONALA *et al.*, 1998). Aliar o teste da motilidade ao longo do tempo com a utilização de uma combinação de várias características seminais pode resultar em uma maior precisão para discriminar a fertilidade (GADEA, 2005). Juonala *et al.* (1998) correlacionaram positivamente a motilidade (avaliada subjetivamente) e a integridade da membrana plasmática (avaliada por sondas fluorescentes) do sêmen armazenado durante 7 dias com o tamanho da leitegada e taxa de não retorno ao estro até 60 dias após as IAs, quando utilizado em fêmeas múltíparas com doses de 3 bilhões de células. Kummer *et al.* (2013), ao avaliarem as características seminais através do CASA, juntamente com inseminações artificiais homospérmicas (2 bilhões de células espermáticas), observaram que o grupo classificado como subfêrtil demonstrou redução de 9,6% na taxa de parto e redução de 2,2 leitões por leitegada, comparado com o grupo de reprodutores que apresentou alta taxa de prenhez (97,9%) e 14,1 nascidos totais.

Portanto, a melhor maneira de avaliar a fertilidade do reprodutor é através da taxa de parto e número de nascidos totais após a inseminação *in vivo* (GADEA *et al.*, 2004). Assim, uma abordagem possível para a detecção dos reprodutores subfêrteis do plantel é a combinação do uso sêmen de machos com diferentes sensibilidades ao tempo de armazenamento da dose, com a utilização de apenas uma inseminação por estro com dose inseminante (DI) contendo reduzido número de células espermáticas. Isso permitirá uma análise individual da fertilidade dos reprodutores, impondo um maior desafio no processo de identificação da subfertilidade.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A inseminação artificial (IA) é a tecnologia reprodutiva mais comum na produção suína (BORTOLOZZO *et al.*, 2015). Esta biotécnica, com uso de sêmen líquido resfriado, é consolidada em rebanhos suínos tecnificados e tem contribuído para o aperfeiçoamento de vários aspectos na produção suinícola (KNOX, 2016). Atualmente o seu uso é estimado em mais de 95% do plantel brasileiro (BORTOLOZZO, informação pessoal)

Devido ao amplo uso da IA, tem aumentado o interesse em melhorar as análises qualitativas das amostras de ejaculado, em uma tentativa de estimar o potencial de fertilidade dos machos. É de conhecimento que um único macho tem influência individual maior do que uma fêmea na eficiência e produtividade da atividade suinícola, sendo que esta influência se torna ainda maior com o uso de reprodutores com mérito genético superior em programas de inseminação artificial (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006).

Os procedimentos de IA mais utilizados em granjas suínas envolvem o uso do ejaculado diluído e conservado entre 15 e 18 °C (17 ± 2 °C) por até 72 horas, realizando a deposição cervical ou intrauterina da DI. Na prática são utilizadas doses com grande número de células espermáticas por matriz (1,5 a 3 bilhões de espermatozoides), com realização de 2-3 IAs por estro, totalizando três a nove bilhões de espermatozoides por matriz (BORTOLOZZO *et al.*, 2015; KNOX, 2016; ROCA *et al.*, 2016).

O número excessivo de inseminações somado ao número elevado de espermatozoides em cada DI pode mascarar falhas reprodutivas (ROCA *et al.*, 2016), devido a algumas características espermáticas serem compensadas pelo excessivo número de espermatozoides (FLOWERS, 2013). Com a redução do número de espermatozoides na DI, pode-se, eventualmente, demonstrar problemas de subfertilidade em machos, anteriormente considerados como de alta fertilidade quando usadas DIs convencionais - 3 bilhões de células espermáticas por DI (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006; FLOWERS, 2013).

A identificação desses reprodutores é difícil e quase impossível quando analisado somente um único parâmetro de qualidade seminal. Porém, utilizar os recursos do sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA - *Computer Assisted Analysis System*) com a obtenção de dados mais objetivos sobre a cinética

do espermatozoide, associados a identificação de machos com menor resistência ao resfriamento (armazenamento) das DI e com a utilização de uma única inseminação, pode ser uma ferramenta para melhor identificar os machos subférteis nas centrais de processamento de sêmen.

1.1 Fertilidade do reprodutor suíno

Devido ao uso da inseminação artificial na produção de suínos, um único macho tem grande influência na produtividade do rebanho (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006). Ao empregar machos subférteis e/ou ejaculados de baixa qualidade acaba-se por reduzir o desempenho reprodutivo (FOXCROFT *et al.*, 2010), e por consequência, ocorrem perdas econômicas. Assim, a identificação precoce e subsequente remoção de reprodutores menos férteis é uma prioridade para as centrais de processamento de sêmen (FOXCROFT *et al.*, 2008; ROCA *et al.*, 2015). Embora esses impactos sejam reais, a detecção da fertilidade do reprodutor é complexa e os testes “*in vitro*” da qualidade seminal possuem moderada correlação com os resultados de fertilidade “*in vivo*” para prever ou diagnosticar a subfertilidade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

As metodologias clássicas usadas para identificação da fertilidade dos reprodutores através de testes *in vitro*, acabam somente identificando reprodutores de baixa fertilidade. É difícil testar todos os atributos qualitativos do ejaculado dentro de uma população heterogênea de espermatozoides para se ter uma acurácia sobre o potencial de fertilização do ejaculado (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003). Algumas avaliações do ejaculado como volume, concentração espermática, total de células espermáticas e intervalo entre coletas, não apresentaram correlação com a taxa de parto e nascidos totais (JUNG *et al.*, 2015). Alguns trabalhos tem apresentado correlação da fertilidade com a motilidade (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012; KUMMER *et al.*, 2013), morfologia (SCHULZE *et al.*, 2013; MCPHERSON *et al.*, 2014) e integridade de membrana (JUONALA *et al.*, 1998). Entretanto, somente com estas avaliações convencionais da fertilidade não se consegue diferenciar os reprodutores férteis dos subférteis.

Saacke *et al.* (2000) descreveram duas características diferentes dos espermatozoides que afetam a fertilidade do reprodutor: características compensáveis e características não compensáveis. As características compensáveis

são aquelas que podem ser superadas através da utilização de um grande número de espermatozoides em cada inseminação. Assim, problemas com motilidade e morfologia, são compensadas quando há um aumento de espermatozoides na DI, sendo a redução da fertilidade minimizada (FOXCRÖFT *et al.*, 2010). Já as características não compensáveis são aquelas que não podem ser superadas pelo aumento de espermatozoides na DI (SAACKE *et al.*, 2000). Estes defeitos estão associados a problemas morfológicos celulares, vacúolos nucleares e na estrutura da cromatina espermática que afetam a fertilização e desenvolvimento embrionário (FOXCRÖFT *et al.*, 2010).

Para efetivamente prever a fertilidade, é essencial discriminar entre características espermáticas compensáveis e não compensáveis em um ejaculado (FOXCRÖFT *et al.*, 2010). A avaliação da fertilidade relativa do macho *in vivo* usando números elevados de espermatozoides por dose (≥ 3 bilhões) poderá mascarar diferenças em parâmetros compensáveis e não permitirá que a indústria identifique os reprodutores que apresentaram melhores resultados na IA (FOXCRÖFT *et al.*, 2010). Devido as práticas atuais, as diferenças na produtividade do reprodutor estão confundidas pelo uso de doses e inseminações artificiais heterospérmicas, além da concentração elevada, como pode ser observado na **Figura 1**, a qual mostra a curva de fertilidade de reprodutores comerciais. O lado esquerdo ilustra a variação entre os machos com uma curva de fertilidade em termos número de leitões nascidos vivos em relação ao número de espermatozoides na dose de inseminação. Em contraste, o lado direito ilustra machos que demonstram ter resposta linear em termos de número de leitões nascidos vivos ao longo das doses de inseminação testadas.

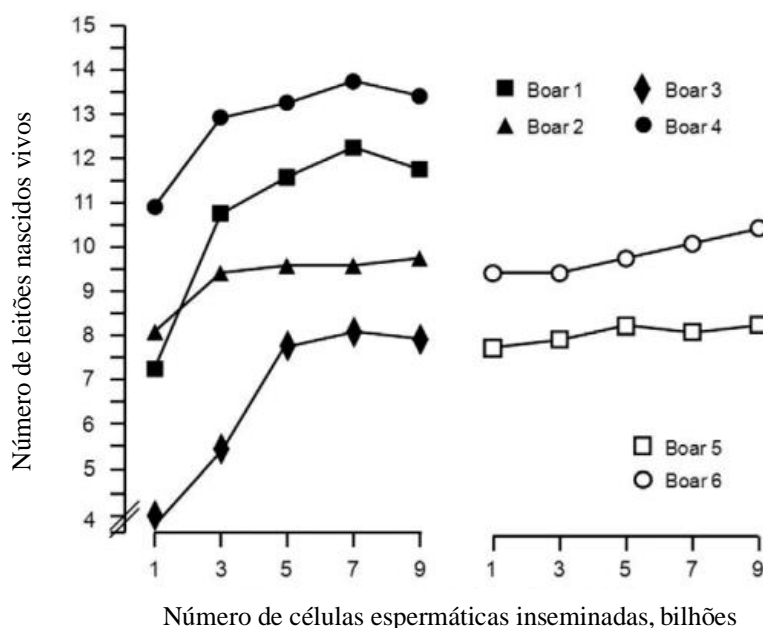


Figura 1. Relações entre a concentração da dose inseminante e número de nascidos vivos de reprodutores comerciais selecionados.
Fonte: (FLOWERS, 2013).

Existem duas metodologias que podem ser empregadas *in vivo* para se obter dados sobre a fertilidade do reprodutor suíno. A primeira metodologia faz a utilização de doses heterospérmicas com a posterior análise de DNA para a identificação da paternidade dos descendentes (FERREIRA *et al.*, 2015; FLOWERS *et al.*, 2016). Com essa abordagem, o mesmo número de espermatozoides de diferentes machos é inseminado, e competem entre si pela fertilização dos oócitos (FLOWERS *et al.*, 2016). Contudo, essa metodologia é muito onerosa devido a utilização de exames de DNA de cada descendente, para saber o número de leitões exatos de cada reprodutor. O outro método de obtenção da fertilidade dos reprodutores é através da utilização de doses e IA homospermáticas. As diferenças na fertilidade se tornam mais evidentes quando o número de espermatozoides na dose para a IA é reduzida. De modo geral, a aplicação combinada da inseminação intrauterina e o uso de uma única inseminação em tempo fixo, pode expressar mais claramente o potencial de fertilidade do reprodutor (FOXCROFT *et al.*, 2010).

No estudo de Ruiz-Sanchez *et al.* (2006), utilizando apenas 1,5 bilhão de espermatozoides morfolologicamente normais por DI (<15% defeitos totais), com motilidade superior a 80% e utilizando aproximadamente 50 leitões inseminadas

por reprodutor, foi possível observar diferenças substanciais na fertilidade do reprodutor *in vitro* e *in vivo*. Neste mesmo estudo, foi possível observar a diferença na motilidade durante o 3º, 7º e 10º dia de conservação das DIs, de reprodutores considerados de boa fertilidade. Já em relação ao teste *in vivo* foi observado uma diferença de mais de 15% na taxa de parto e mais de dois leitões nascidos totais por leitegada entre os reprodutores férteis e subférteis. Além disso, este trabalho conseguiu correlacionar a motilidade ao longo do tempo de conservação com as variáveis de fertilidade *in vivo* (taxa de prenhez, taxa de parto e total de nascidos). Williams *et al.* (2011), utilizando 2 bilhões de espermatozoides por dose com IA tradicional em 50 leitoas por macho (41 reprodutores), também observaram diferenças entre os reprodutores para taxa de prenhez (amplitude 68,5 a 100%), taxa de parto (64,8 a 100% - **Figura 2**), nascidos totais (9,46 a 14,28) e nascidos vivos (9,05 a 13,04 – **Figura 3**). De forma geral, essa avaliação é objetiva e proporciona as diferenças entre os reprodutores sobre o desempenho reprodutivo a campo (taxa de prenhez, taxa de parto e nascidos totais) (ROCA *et al.*, 2015).

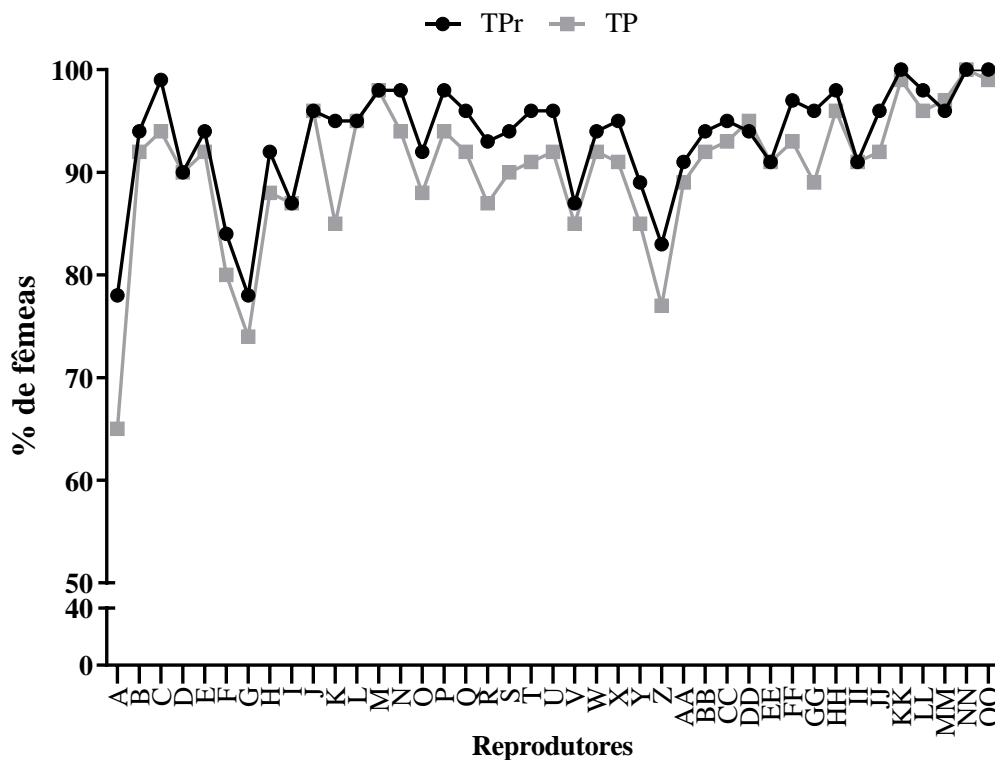


Figura 2. Média da taxa de prenhez e parto por reprodutor.

Fonte: Adaptado de Williams *et al.* (2011)

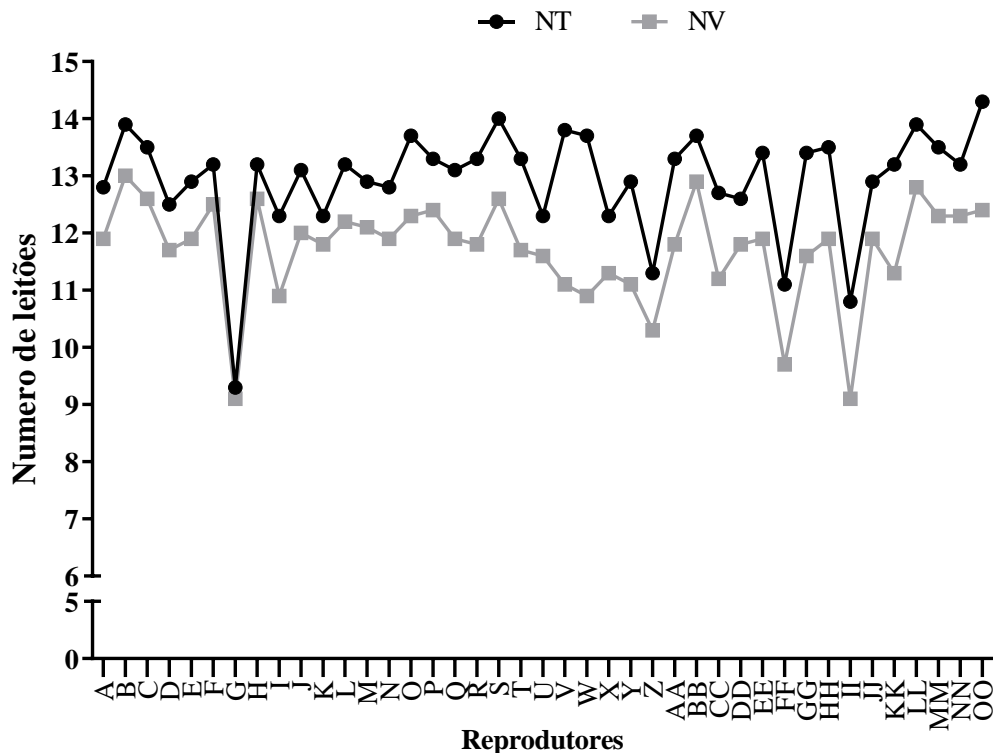


Figura 3. Média de nascidos totais e nascidos vivos por reprodutor.

Fonte: Adaptado de Williams *et al.* (2011).

1.2 Avaliação espermática

A avaliação dos espermatozoides deve ser realizada com exatidão para garantir o uso de animais com boa fertilidade, o que resulta em excelentes índices reprodutivos. As avaliações de motilidade, morfologia e outras características que influenciam a funcionalidade espermática devem ser realizadas a cada ejaculado para que tenhamos a certeza da qualidade do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial (LUCCA, 2016). Com o avanço da técnica de inseminação artificial intrauterina, somado a redução do número de espermatozoides por dose e o uso de reprodutores com mérito genético superior em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a análise da qualidade espermática se tornou mais valorizada.

Nos últimos anos novas tecnologias foram desenvolvidas para avaliar a fertilidade *in vitro* dos espermatozoides (JUNG *et al.*, 2015) na tentativa de eliminar machos subférteis, mas também para reduzir o tempo de espera dos resultados das centenas de IAs necessárias para a avaliação da fertilidade do reprodutor a campo (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006). Contudo, na prática as análises da morfologia e

motilidade são os exames rotineiros mais utilizados para avaliar a qualidade do sêmen em centrais (BERNARDI, 2008) e somente essas características não proporcionam uma avaliação precisa da fertilidade do reprodutor. Assim, a utilização da avaliação das DI ao longo do tempo de conservação, poderá estimar a fertilidade do reprodutor.

1.2.1 Motilidade espermática

A motilidade é um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no oócito (BERNARDI, 2008). Por isso, a motilidade é um parâmetro utilizado para se estabelecer um limite mínimo aceitável para o uso do sêmen na produção de DIs, sendo usualmente considerado o valor de referência de no mínimo 70% de motilidade espermática (BORTOLOZZO *et al.*, 2005b). Além disso, a estimativa da motilidade tem sido de importância fundamental no controle diário da qualidade do sêmen. O controle regular desse parâmetro, após diluição e durante o período de armazenamento fornece informação sobre a capacidade de manutenção da integridade espermática (JOHNSON *et al.*, 2000).

A estimativa visual da percentagem de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen ainda é o ensaio laboratorial mais utilizado (MOCÉ & GRAHAM, 2008), por ser prático, rápido e barato (GADEA, 2005). Contudo, esta metodologia de avaliação espermática é subjetiva, ou seja, é dependente do treinamento do avaliador (GADEA, 2005), o que leva a uma grande variabilidade nos resultados da análise e dificulta a estimativa do efeito da motilidade espermática sobre os parâmetros de fertilidade do reprodutor (BROEKHUIJSE *et al.*, 2011b).

Com o avanço da tecnologia nos últimos anos na indústria suína, a análise do sêmen pelo CASA é capaz de captar o movimento individual dos espermatozoides pelo deslocamento da cabeça (Revisado por AMANN & WABERSKI, 2014) e assim, processar a informação da trajetória percorrida fornecendo os parâmetros a respeito da cinética individual dos espermatozoides (**Tabela 1 e Figura 4**) e as médias de motilidade espermática (AMANN & KATZ, 2004), permitindo assim, uma avaliação padronizada de múltiplos parâmetros cinéticos do espermatozoide (WABERSKI *et al.*, 2011). Isto permite uma análise objetiva das amostras, e portanto, a técnica fornece um valor contínuo do número exato de

espermatozoides que foram considerados móveis ou imóveis (BROEKHUIJSE *et al.*, 2011b).

Tabela 1. Descrições dos parâmetros de cinética espermática assessorada pelo *computer assisted semen analysis*.

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

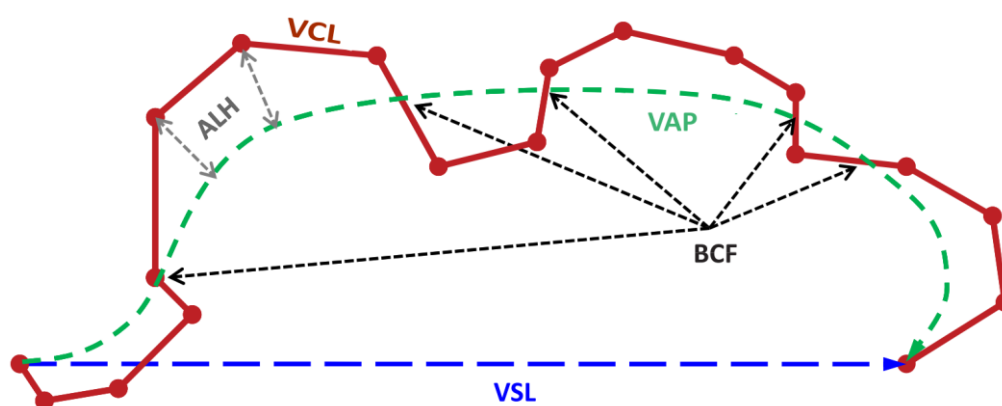


Figura 4. Representação dos parâmetros de cinética espermática assessorada pelo *computer assisted semen analysis*.

Fonte: adaptado de Duffy *et al.* (2015).

Com a utilização do sistema CASA para análise do movimento, a avaliação da motilidade espermática apresenta dados mais fidedignos sobre a movimentação dos espermatozoides. Broekhuijse *et al.* (2012) reportaram efeitos significativos da motilidade total e progressiva, além dos parâmetros cinéticos (VCL, BCF, VAP, VSL e ALH) sobre a taxa de parto e tamanho de leitegada. Entretanto, estudos indicam que apenas 5 a 6% dos problemas de fertilidade podem ser explicados por

parâmetros relacionados ao macho e espermatozoide quando analisado o sêmen *in natura*. Já quando analisado o sêmen armazenado por um período de até sete dias, a motilidade total apresenta influência sobre o tamanho de leitegada (JUONALA *et al.*, 1998). Portanto, para melhor predizer a fertilidade dos machos suínos, a análise de motilidade deve ser realizada durante o período de armazenamento das doses de sêmen.

1.2.2. Morfologia espermática

A avaliação morfológica do sêmen compreende uma classificação qualitativa da morfologia dos espermatozoides. O seu objetivo é fornecer uma estimativa do funcionamento do epitélio seminífero e da maturação espermática no epidídimo (GADEA, 2005), por isso é uma avaliação comumente utilizada nas CPSs. O ejaculado pode apresentar uma certa proporção de espermatozoides morfológicamente anormais, mesmo sendo de reprodutores saudáveis (JUNG *et al.*, 2015). Quando estas anormalidades estão dentro dos limites aceitáveis a morfologia espermática parece ter valor limitado para a predição da fertilidade (BERNARDI, 2008; FEITSMA, 2009).

De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) os parâmetros considerados normais para o sêmen *in natura* e para a dose de sêmen resfriada são, respectivamente, de até 30% e 20% de alterações morfológicas totais. Porém, com o advento da inseminação artificial intrauterina o exame de morfologia espermática se tornou mais importante. Devido a redução do número de espermatozoides na DI os defeitos morfológicos passaram a ser importantes para o desempenho reprodutivo, podendo afetar a fertilidade (SAACKE *et al.*, 2000).

A proporção total de espermatozoides com defeitos de gota citoplasmática proximal e distal afeta negativamente a taxa de prenhez e o tamanho da leitegada (JUNG *et al.*, 2015). Além disso, estes mesmos autores citam que a redução no número de espermatozoides na DI, aumenta o impacto da gota citoplasmática no tamanho da leitegada. O fato de que a presença de gotas citoplasmáticas está associada com a fertilidade pode ser explicada pelas observações de que o percentual de espermatozoides com gota citoplasmática ou de espermatozoides com defeitos, estão negativamente correlacionados com a capacidade de ligação ao epitélio do oviduto (PETRUNKINA *et al.*, 2001).

1.3 Marcadores proteicos do plasma seminal

O ejaculado consiste em espermatozoides suspensos em um fluido chamado plasma seminal (JUYENA & STELLETTA, 2012). Já o plasma seminal é composto pelas secreções do epidídimo (contendo muitos componentes orgânicos e inorgânicos) (FOXCROFT *et al.*, 2008) e das glândulas sexuais acessórias (próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral), sendo que o fluido da vesícula seminal constitui a maior fração do plasma seminal (JUYENA & STELLETTA, 2012). Estes componentes contribuem nas funções bioquímicas do ejaculado, possuindo altas concentrações de diferentes aminoácidos, peptídeos, lipídeos, bem como diferentes proteínas que exercem diversos papéis na função espermática (CAMPANERO-RHODES *et al.*, 2005), podendo influenciar a motilidade, taxa de sobrevivência e potencial de fertilidade do espermatozoide (STRZEZEK *et al.*, 2005).

A análise das proteínas presentes no plasma seminal é uma opção para avaliar a fertilidade do reprodutor suíno. Tal abordagem é uma ferramenta oportuna, para identificar proteínas que desempenham papéis fundamentais na maturação espermática e no processo de fecundação (BUSTAMANTE-FILHO *et al.*, 2014). Recentes estudos (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014; PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2016; PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2018) foram realizados para caracterizar o proteoma do plasma seminal e mais de 500 proteínas foram identificadas. O plasma seminal contém muitas proteínas que apresentam importante função durante a capacitação espermática, fertilização (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011) e também podem servir para proteger os espermatozoides contra danos, mantendo a longevidade das células. Ao analisar as proteínas do plasma seminal de 33 ejaculados, foi possível identificar 536 proteínas, destas 374 são pertencentes a toxonímia *Sus scrofa*, deste total 32% foram relacionadas com características de adesão (*spermadhesins*), enquanto apenas 3% dessas proteínas foram relacionadas exclusivamente a funções reprodutivas (PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2016).

As proteínas que foram identificadas no plasma seminal suíno e estão majoritariamente presentes são AQN-1, AQN-3 (figura 5), AWN, PSP-I e PSP-II. São proteínas pertencentes ao grupo das *spermadhesins* (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014), e podem ser classificadas como proteínas ligantes à heparina (AQN-1, AQN-3, AWN) e proteínas não ligantes à heparina (PSP-I/PSP-II;) (RODRÍGUEZ-

MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Novak *et al.* (2010) identificaram proteínas específicas da fração espermática, tal como PSP-1 e a GPX5, associadas negativa e positivamente com a fertilidade do cachão *in vivo*. Já May *et al.* (2015) destacaram quatro proteínas entre os machos com diferentes taxas de fertilidade (alta e baixa fertilidade, prenhez 99,2% e 85,5%, nascidos vivos 12,41 e 11,93, respectivamente), AQN-3, PSP-I, PSP-II, GPX5 ($P < 0,01$), e a AQN-1 ($P = 0,06$).

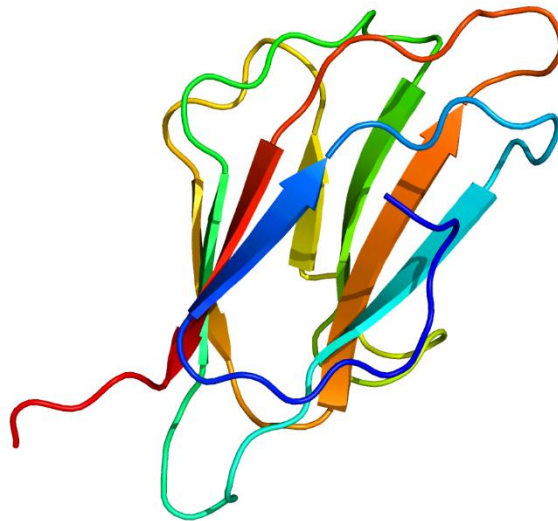


Figura 5. Estrutura tridimensional da proteína *Carbohydrate-binding protein* AQN-3 da família das *spermadhesin*.

Proteínas classificadas em outras categorias também podem exercer funções ligadas à reprodução, como é o caso da família das *cathepsins*, que possuem ação proteolítica e estão relacionadas com a modulação da membrana plasmática ao longo do trânsito epididimário (PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2016). Outras proteínas como IgM, FN1, *Immunoglobulin G-binding protein* são inversamente associadas com defeitos de cauda e peça intermediária, e a *Lactadherin* teve associação positiva com a motilidade espermática e uma associação negativa com defeitos de peça intermediária e cauda (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014).

Em um estudo recente, De Lazari *et al.* (2019) identificaram que as proteínas PSP-I, *cathepsin B*, *epididymal secretory protein E1* e *IgG Fc binding protein* foram mais abundantes em ejaculados de maior resistência ao resfriamento, enquanto a proteína *major seminal plasma PSPI* (variação da PSP-I) prevaleceu em ejaculados que demonstraram baixa resistência ao resfriamento a 17°C. Contudo,

em um estudo mais antigo a proteína PSP-1 foi associada negativamente a motilidade espermática ao longo de sete dias (DYCK *et al.*, 2011). Novak *et al.* (2010) sugerem que as proteínas podem reduzir a fertilidade quando em excesso ou quando expostas por longos períodos com as células espermáticas. Ainda precisamos entender melhor as associações existentes entre as proteínas do plasma seminal com a fertilidade. De forma geral, a análise da proteômica do sêmen suíno tem contribuído com diversos avanços na compreensão da fisiologia espermática e da relação entre espermatozoides e plasma seminal sobre as características espermáticas e a fertilização. Portanto, a utilização de marcadores proteicos para a avaliação da fertilidade do reprodutor poderá prover informações que poderão ser utilizadas para a identificação de reprodutores subfêrteis e assim removê-los do rebanho.

1.4 Diluentes para uso em sêmen suíno

O termo diluente refere-se a uma solução líquida, usada para preservar as características funcionais das células espermáticas (GADEA, 2003). Para tanto, este também é responsável por fornecer nutrientes necessários para a manutenção metabólica da célula espermática. Esta manutenção ocorre através da redução da atividade metabólica da célula espermática, uma vez que as células são mantidas em temperatura de 15 a 18°C .

Todo diluente deve possuir funções básicas para manter a célula viável, como aumentar o volume total do ejaculado, suprir a necessidade de nutrientes para a produção de energia, permitir a proteção dos espermatozoides contra o choque térmico, apresentar tampão capaz de controlar a flutuação do pH, possuir sais básicos, permitir balanço osmótico e também a inibição do desenvolvimento bacteriano (JOHNSON *et al.*, 2000; LEVIS, 2000).

Para exercer tais funções, estes são compostos por uma ampla variedade de substâncias quimicamente diferentes entre si, que têm a finalidade de manter os espermatozoides viáveis até o momento da IA (FERREIRA *et al.*, 2005). Atualmente, há uma grande variedade de diluentes comerciais para o sêmen suíno e estes são classificados com base no período de manutenção da viabilidade do espermatozoide em quatro tipos: de curta ação (três a quatro dias), de média ação (cinco a seis dias),

de longa ação (sete a oito dias) e de extra longa ação (mais de oito dias) (LEVIS, 2000; PINART *et al.*, 2015).

Dentre os diluentes de curta duração o *Beltsville Thawing Solution* é o mais utilizado pela indústria suinícola. Em sua formulação apresenta a glicose como principal fonte de energia (GADEA, 2003) e devido ao seu balanço eletrolítico mais próximo do fisiológico (JOHNSON *et al.*, 2000) mantém a viabilidade da célula espermática por até 72 horas na temperatura de armazenamento de 15 a 18 °C (HUO *et al.*, 2002; SEVERO *et al.*, 2011). Por ser bastante conhecido e ter a sua formulação prontamente disponível, o BTS serve como parâmetro para comparação com novos diluentes (GADEA, 2003).

Embora os diluentes de curto prazo são amplamente utilizados com bons resultados, os diluentes de longa duração são interessantes porque estes preservam não somente a viabilidade espermática, mas também a motilidade espermática por um período maior (GADEA, 2003). A possibilidade de usar sêmen refrigerado além de cinco dias, sem que a eficiência reprodutiva seja afetada (manutenção da taxa de parto e do tamanho da leitegada) (TEIXEIRA *et al.*, 2015), poderia melhorar a logística de produção e distribuição das doses de sêmen. Para isso, alguns diluentes foram desenvolvidos a fim de possibilitar o aumento no tempo de armazenamento para 5 a 7 dias (LEVIS, 2000). Entre estes diluentes considerados de longa duração existe o Androstar[®] Plus (Minitube GmbH, Tiefenbach, Alemanha).

Muitos trabalhos têm avaliado a motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossoma, com o uso de diluentes de curta e longa duração durante o período de armazenamento (KOMMISRUUD *et al.*, 2002; DUBÉ *et al.*, 2004; VYT *et al.*, 2004; DE AMBROGI *et al.*, 2006; ESTIENNE *et al.*, 2007; DZIEKOŃSKA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2015). Estes estudos demonstraram que os diluentes de longa duração, comparado aos de curta duração, conseguem manter a motilidade e viabilidade espermática superior nos primeiros três dias de armazenamento.

Nesta mesma linha, Pinart *et al.* (2015) compararam os diluentes BTS e Duragen[®] (Magapor, Zaragoza, Espanha) (extra longa duração) por 48 horas e observaram que o Duragen possuiu maior capacidade de preservação do que o BTS, com porcentagens maiores de motilidade progressiva, integridade de membrana e acrossoma em todo o período experimental (dezembro a julho). Porém apesar de ser superior ao BTS nas capacidades de preservação, a taxa de prenhez (> 90%) e tamanhos da leitegada (> 10) foram semelhantes entre os dois diluentes.

Na prática, os ejaculados muitas vezes são preservados em diluentes de longa ou extra-longa duração, no entanto para uso das doses em períodos de até 72 horas e raramente por mais de 5 dias (120 h). Esse procedimento é realizado pois acredita-se que o desempenho reprodutivo é melhor quando se utiliza diluentes de longa duração quando comparado aos de curta duração. Contudo, existe pouca informação científica sobre esse tema.

1.5 Resfriamento e armazenamento da dose inseminante

A utilização do sêmen suíno refrigerado é predominante na indústria suinícola, em relação ao sêmen congelado. Apesar da disponibilidade de vários protocolos de congelamento ainda há uma baixa taxa de sobrevivência espermática ao processo congelamento/descongelamento do espermatozoide (JOHNSON *et al.*, 2000; GERRITS *et al.*, 2005; KNOX, 2016). A temperatura de armazenamento das doses de sêmen é entre 15 e 18 °C (JOHNSON *et al.*, 2000). Essa baixa temperatura de armazenamento tem a função de desacelerar os processos metabólicos, ocasionando um menor consumo de energia por parte do espermatozoide (ALMEIDA *et al.*, 2015).

As temperaturas inferiores a 15 °C provocam danos irreversíveis às membranas do espermatozoide (JOHNSON *et al.*, 2000), e quando as temperaturas são maiores que 20 °C o espermatozoide eleva sua taxa metabólica, conseqüentemente há um aumento de consumo da fonte de energia do diluente resultando em uma curta “vida útil” da DI (YOUNG *et al.*, 2008). Portanto, o ideal é conservar as doses inseminantes a uma temperatura constante, evitando oscilações (JOHNSON *et al.*, 2000). Porque as oscilações de 2 a 3 °C afetam a viabilidade espermática levando a uma alteração na organização dos lipídios das membranas celulares do espermatozoide, conseqüentemente alterando a permeabilidade e a função da membrana, acarretando na morte espermática (YOUNG *et al.*, 2008).

Além da temperatura, outro fator que pode alterar a qualidade da célula espermática é o tempo de armazenamento da DI. As alterações estruturais e funcionais dos espermatozoides durante o armazenamento da dose assemelham-se a um processo de envelhecimento natural e podem ser determinadas pelas condições e pelo tempo de armazenamento (JOHNSON *et al.*, 2000). Isto constitui um desafio para a manutenção da qualidade da célula espermática, pois os atributos funcionais

e estruturais dos espermatozoides são suscetíveis a danos durante o armazenamento (WATERHOUSE *et al.*, 2004). Especialmente as membranas do espermatozoide são consideradas como altamente suscetíveis aos efeitos do armazenamento (WABERSKI *et al.*, 2011)

Na prática, para a detecção do efeito do armazenamento podemos utilizar parâmetros básicos como a motilidade e a integridade de membrana (WABERSKI *et al.*, 2011). A motilidade acaba sendo um indicador do metabolismo e da integridade das membranas plasmáticas, pois é um dos parâmetros de qualidade espermática mais comumente associada com a conservação e a fertilidade (WATERHOUSE *et al.*, 2004). Além disso, quando avaliado ao longo do tempo demonstra ter maior associação com a fertilidade. Alguns autores (JUONALA *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2002; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006) demonstraram uma variação individual entre os reprodutores sobre a capacidade da preservação da qualidade durante a conservação da DI. Reprodutores que conseguem manter a motilidade acima de 60% por um período igual ou superior a cinco dias após coleta apresentaram correlação positiva com o desempenho *in vivo* (JUONALA *et al.*, 1998; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006).

Após a ejaculação começa o chamado *timing* de vida do espermatozoide, ou seja, a redução da sua viabilidade até a perda total da mesma ou morte. Este envelhecimento dos espermatozoides durante o armazenamento é um processo fisiológico que não pode ser completamente evitado, porém deve-se ter um cuidado adicional no momento da inseminação em relação à ovulação para manter uma fertilidade satisfatória (JOHNSON *et al.*, 2000). Portanto, após a diluição e durante o armazenamento, é importante que os espermatozoides mantenham mais de 70% de células móveis e que não haja uma diferença maior que 10% de motilidade entre o ejaculado *in natura* e pós-diluído (FERREIRA *et al.*, 2005; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006).

1.6 Inseminação Artificial

A inseminação artificial é a biotécnica reprodutiva mais comum na suinocultura industrial (BORTOLOZZO *et al.*, 2015). O principal objetivo está relacionado à otimização do uso dos machos reprodutores de alto mérito genético (KNOX, 2016), fazendo com que o uso dos ejaculados seja maximizado sem que ocorra uma redução na eficiência reprodutiva e produtiva do plantel (FERREIRA *et al.*, 2005).

A técnica de IA pode ser classificada de acordo com o local de deposição da DI em IA tradicional ou IA intrauterina. Na inseminação tradicional normalmente são realizadas de duas a três inseminações por estro, com deposição intracervical e tradicionalmente, a DI contém de 2 a 4 bilhões de espermatozoides, em volume de 80 a 100 mL. Essa necessidade de grande volume e número de espermatozoides na dose inseminante é devido as características anatômicas da cérvix e dos cornos uterinos da fêmea suína (DALLANORA *et al.*, 2004). Contudo, com o advento da técnica de inseminação artificial intrauterina (ou pós-cervical, IAU), foi possível reduzir o número de espermatozoides na DI (1 a 2 bilhões de espermatozoides) e o volume para 40 a 50 ml. A redução tanto na concentração como no volume é devido a deposição da DI diretamente no lúmen uterino. Em consequência disso, reduz-se o tempo e a distância que os espermatozoides devem percorrer até a junção útero-tubárica e diminuindo a perda de células por refluxo após IA (KNOX *et al.*, 2017). Assim, na IAU mesmo com a utilização de um menor número de células espermáticas e menor volume de diluente não houve redução no desempenho reprodutivo no plantel (BENNEMANN *et al.*, 2005).

Outro método de otimizar a IA é através da redução do número de inseminações por estro, por exemplo, realizando inseminações a cada 24 horas, o que, consequentemente, levaria a uma redução do número de DIs e de células por fêmea inseminada. A longa duração do estro em fêmeas suínas associada à grande variabilidade do momento da ovulação exige que as inseminações sejam realizadas em intervalos que proporcionem a manutenção de um número de células espermáticas viáveis no trato reprodutivo no momento da ovulação, o que eleva o número de DIs por fêmea (ULGUIM, 2014). Uma maneira de se contornar esse gargalo é através da utilização de protocolos de sincronização da ovulação que permitem a realização de uma única inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

A IATF preconiza a sincronização do ciclo estral através de combinações hormonais que estimulam o desenvolvimento folicular e posteriormente induzem a ovulação para que a IA seja realizada em um momento específico (FONTANA, 2013). O emprego da IATF em suínos é lento, devido aos custos associados ao uso de drogas para sincronização da ovulação, que podem ser maiores do que os benefícios gerados (FRIES *et al.*, 2010). Contudo a utilização desse método para avaliação da fertilidade de reprodutores, utilizando uma única DI por estro pode ser

uma prática importante, para estudar e identificar com maior acurácia o desempenho individual de reprodutores.

1.6.1. Intervalo ideal inseminação - ovulação

A espécie suína doméstica é considerada poliéstrica anual, a duração do seu ciclo estral é em média de 21 dias (variação de 18-24 dias), sendo que a fase estral apresenta duração de três dias (BORCHARDT NETO *et al.*, 2005). O estro é definido pelo período próximo à ovulação onde a fêmea demonstra reflexo de imobilidade na presença de um macho e mantém-se receptiva a monta ou IA (SOEDE *et al.*, 2011). Este período apresenta duração em torno de 50 a 60 horas, variando entre 24 e 88 horas em pluríparas (SOEDE *et al.*, 2011).

A ovulação é definida como o momento em que ocorre a ruptura dos folículos terciários e liberação dos oócitos (BORCHARDT NETO *et al.*, 2005), sendo este um fenômeno dinâmico e espontâneo (FRIES *et al.*, 2010) que ocorre geralmente no início do terço final do estro (SOEDE *et al.*, 1995). O momento médio de ovulação varia de 37 a 45 horas após o início do estro, no entanto a amplitude pode ser de 8 a 85 horas (FRIES *et al.*, 2010). Estes oócitos ovulados apresentam uma vida limitada (JOHNSON *et al.*, 2000), devido a curta duração da sua vida útil, de 4 a 8 horas, no trato genital da fêmea (BORTOLOZZO *et al.*, 2005a). Essa amplitude dificulta a adoção de um protocolo fixo de inseminação (BORCHARDT NETO *et al.*, 2005). Contudo, a utilização de protocolos hormonais permite uma melhor predição do momento da ovulação (ULGUIM, 2014).

O controle hormonal da ovulação tem sido eficaz para a reduzir a variação no tempo de ovulação em suínos com o uso de eCG (gonadotrofina coriônica equina) associada ou não ao hCG (gonadotrofina coriônica humana), pLH (hormônio luteinizante suíno purificado), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e análogos de GnRH (KNOX *et al.*, 2017). Esse controle tem como objetivo a utilização de uma única inseminação em tempo fixo, que deve ser realizada dentro do período de 24 horas antes da ovulação (período ideal), para manter a taxa de prenhez e tamanho de leitegada dentro de resultados satisfatórios (SOEDE *et al.*, 1995). Nesse sentido, a IATF poderá ser utilizada como uma metodologia para avaliar a fertilidade dos machos suínos *in vivo* utilizando baixo número de espermatozoides por fêmea inseminada e, portanto, impondo maior desafio de seleção de fertilidade.

CAPÍTULO II – PRIMEIRO MANUSCRITO

*CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE SUÍNOS CLASSIFICADOS DE
ACORDO COM À MANUTENÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA
DURANTE O ARMAZENAMENTO A 17°C EM DILUENTES DE CURTA E
LONGA AÇÃO*

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO

**Características espermáticas de suínos classificados de acordo com à
manutenção da qualidade espermática durante o armazenamento a 17°C em
diluentes de curta e longa ação**

Resumo

O objetivo foi avaliar parâmetros de cinética e movimento espermático de reprodutores suínos classificados de acordo com a capacidade de manutenção da motilidade espermática progressiva em baixa ou alta preservação, considerando a utilização de diferentes tipos de diluentes (curta ou longa ação) durante o armazenamento a 17°C. Doze reprodutores foram classificados em baixa (BP) e alta preservação (AP) pela capacidade de manutenção da motilidade progressiva ao 5º dia, em diluentes de curta ação armazenados a $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Após a seleção, os ejaculados destes reprodutores foram diluídos (*split sample*) em diluentes de curta e longa ação em um fatorial 2x2, em coletas semanais (6 semanas). Os reprodutores BP vs AP (65,3 % vs 84,5%) diferiram quanto a motilidade progressiva ($P < 0,01$). Na motilidade espermática total (MT) e progressiva (MP), não houve interação entre classe do reprodutor, diluente e tempo de armazenamento ($P \geq 0,80$). Na MP houve interação entre diluente e tempo de armazenamento ($P < 0,05$). No dia 10 de armazenamento a MT e MP apresentou efeito da classe do reprodutor ($P < 0,01$). A MT e a MP foram diferentes em relação ao diluente ($P < 0,01$). Para a interação entre a classe do reprodutor e diluente somente a variável ALH foi afetada ($P \leq 0,02$). Para a interação entre classe do reprodutor e tempo de armazenamento houve um efeito ($P \leq 0,03$) para as variáveis ALH, LIN, STR e WOB. A interação entre diluente e tempo de armazenamento para as variáveis VSL, LIN, STR e WOB foi significativa ($P \leq 0,04$). A classe do reprodutor demonstrou efeito individual ($P < 0,01$) para as variáveis VCL, VSL, VAP e BCF. O tempo de armazenamento

influenciou ($P < 0,04$) as variáveis VCL e VAP. O BCF apresentou efeito do diluente ($P < 0,01$). Em relação a avaliação destes parâmetros no dia 10 de armazenamento as variáveis LIN e WOB apresentaram interação entre classe do reprodutor e diluente ($P \leq 0,02$). Já as variáveis VCL, VSL, VAP, BCF e ALH apresentaram efeito individual da classe do reprodutor ($P < 0,01$). O BCF apresentou efeito individual do diluente ($P < 0,04$). Os reprodutores classificados como AP demonstram manter os parâmetros de movimento espermáticos acima dos valores mínimos por 10 dias de armazenamento independente do diluente utilizado.

Palavras-chave. Motilidade progressiva, espermatozoide, resistência ao resfriamento

Abstract

The aim of this study was to evaluate sperm kinetics and movement parameters of boars classified according to their capability in maintaining sperm progressive motility in low or high preservation, considering the utilization of two extenders (short- or long-term) during storage at 17°C. Twelve boars were classified in low (LP) or high preservation (HP) according to their capability in maintaining progressive motility in the fifth day in short-term extenders and stored at $17 \pm 1^\circ \text{C}$. After selection, ejaculates were diluted (split sample) in short and long-acting extenders (2x2 factorial). Each boar was collected weekly during 6 weeks. Progressive motility differed between LP and HP boars (65.3% vs. 84.5%) during the selection period ($P < 0.01$). In relation to total (TM) and progressive motility (PM), there was no interaction between boar class, extender and time of storage ($P \geq 0.80$). In PM, there was an interaction between extender and time of storage ($P <$

0.05). At day 10 of storage, there was an effect of boar class in TM and PM ($P < 0.01$). TM and PM were different in relation to extender ($P < 0.01$). Only the AHL variable was affected by the interaction boar class and extender ($P \leq 0.22$). Variables AHL, LIN, STR and WOB were affected by the interaction between boar class and time of storage ($P \leq 0.03$). There was interaction ($P \leq 0.04$) between extender and time of storage on variables VSL, LIN, STR and WOB. The individual effect of boar class was observed in variables VCL, VSL, VAP and BCF ($P < 0.01$). Time of storage affected ($P < 0,04$) variables VCL and VAP. BCF exhibited effect of extender ($P < 0.01$). In relation to these parameters on day 10 of storage, the LIN and WOB presented interaction between boar class and extender ($P \geq 0.02$). Whereas the variables VCL, VSL, VAP, BCF and ALH exhibited an individual effect of boar class ($P < 0,01$). There was an individual effect of extender on BCF ($P < 0.04$). Boars classified as HP maintained sperm movement parameters above the minimum values for 10 days of storage regardless of the extender used.

Keyword. Progressive motility, sperm, resistance to cooling.

1. Introdução

A inseminação artificial com doses inseminantes refrigeradas tem sido rotineiramente aplicada em suínos (ROCA *et al.*, 2015), sendo atualmente utilizada em 95% do plantel suinícola comercial (WABERSKI *et al.*, 2019). Entre as vantagens da técnica é possível enfatizar o melhor aproveitamento de animais de alto mérito genético, visto que os programas de inseminação artificial utilizam doses de sêmen com reduzido número de espermatozoides que podem ser armazenadas por até cinco dias (WABERSKI *et al.*, 2008). Devido ao grande impacto na fertilidade que o reprodutor pode causar no plantel (SMITAL, 2009), monitorar a qualidade seminal

dos reprodutores tem grande importância para as centrais de produção de sêmen (CPS).

Usualmente as CPS realizam a monitoria da qualidade da dose seminal ao longo do período de armazenamento através da avaliação da motilidade espermática, visto que este parâmetro é um indicador do funcionamento do metabolismo espermático e de integridade das membranas (JOHNSON *et al.*, 2000) e um possível indicador da fertilidade do reprodutor (HENNING *et al.*, 2014). De acordo com Broekhuijse *et al.* (2012), a motilidade espermática *in natura* avaliada pelo sistema CASA explica entre 9 a 10% da variação da fertilidade do reprodutor. Entretanto, alguns estudos (JUONALA *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006) demonstraram que a motilidade espermática, após sete e dez dias de armazenamento, apresenta associação positiva com a fertilidade *in vivo*. Sendo assim, a avaliação da motilidade ao longo do período de armazenamento sob refrigeração poderia ser utilizada para avaliar a fertilidade dos reprodutores (BERNARDI, 2008).

Sabe-se que a qualidade da dose inseminante pode ser influenciada pela temperatura de armazenamento (GACZARZEWICZ *et al.*, 2015), tempo de armazenamento (WATERHOUSE *et al.*, 2004), tipo do diluente (DE AMBROGI *et al.*, 2006), por características individuais dos reprodutores (REIS *et al.*, 2002) ou ainda pela interação destes fatores (ESTIENNE *et al.*, 2007). Quanto a características individuais dos reprodutores, alguns estudos (PAULENZ *et al.*, 2000; KOMMISRUDE *et al.*, 2002) encontraram influência do reprodutor na capacidade de manter a motilidade ao longo do armazenamento. Assim, avaliando a motilidade espermática de reprodutores durante longos períodos de armazenamento das doses, Reis *et al.* (2002) observaram que alguns machos mantêm a qualidade espermática ótima

durante o armazenamento, porém em outros há uma perda de qualidade após um curto período de preservação. Dessa forma é possível fazer uma distinção de reprodutores que mantêm a motilidade espermática durante curtos ou longos períodos de armazenamento em coletas subsequentes. Essas diferenças individuais tornam-se mais marcantes quando o tempo de armazenamento é mais extenso (DE AMBROGI *et al.*, 2006), podendo a complexidade do diluente ter influência maior ou menor sobre a motilidade espermáticas dos indivíduos (ESTIENNE *et al.*, 2007). Nesse sentido, consideramos que o uso de diluentes mais protetivos (longa ação) poderiam melhorar as características espermáticas, principalmente de machos classificados como de curta durabilidade durante o armazenamento. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar parâmetros de cinética e motilidade espermática de reprodutores suínos classificados de acordo com a capacidade de manutenção da motilidade progressiva em baixa ou alta preservação, considerando a utilização de diferentes tipos de diluentes (curta ou longa ação) durante o armazenamento a 17°C por um período de até 240 horas.

2. Material e Métodos

2.1. Instalações e Animais

O estudo foi conduzido em uma CPS localizada no sul do Brasil, no estado de Santa Catarina. O experimento foi conduzido com a aprovação do comitê de ética e uso de animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocolo 34329). Os reprodutores foram alojados em celas individuais (2,4 × 0,7m) em instalações com temperatura ambiental controlada (15 - 23°C). A dieta, com base em milho e soja (12,5% PB; 0,68% lisina digestível; 3,25 Mcal ME/Kg), era fornecida de acordo com o escore corporal visual (1 a 5 - ECV), sendo que

reprodutores com $ECV \leq 3$ e > 3 eram alimentados com 2,4 e 2,2 Kg dia⁻¹, respectivamente.

2.2. Coleta e avaliação do ejaculado *in natura*

As coletas dos ejaculados foram realizadas pela técnica da mão enluvada em um copo pré-aquecido (38°C) revestido com saco plástico com filtro acoplado para remoção da fração gelatinosa (Blue bag[®] - Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Após a coleta, cada ejaculado foi conduzido ao laboratório adjacente à sala de coleta e avaliado quanto ao volume, motilidade e concentração. O volume do ejaculado foi mensurado em balança eletrônica, de forma direta, assumindo-se que 1g equivalia a 1mL de sêmen. A motilidade e a concentração foram avaliados em sistema CASA (Sperm Vision[®] 3.7; Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Para a análise do ejaculado *in natura*, uma amostra foi preparada em um microtubo (Eppendorf[®], Hauppauge, EUA), utilizando um pipetador de mistura eletrônico com taxa de diluição 1:9 (90 µl de ejaculado mais 810 µl de diluente pré-aquecido). Desta amostra, uma alíquota de 3 µl foi utilizada para o preenchimento por fluxo capilar em um slide da câmara de contagem (Leja; 4 câmaras de contagem com 20 µm de profundidade; Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, Holanda). Para padronização das análises utilizou-se uma posição de partida comum dentro de cada slide e foram observados oito campos por amostra. A análise somente foi aceita quando o coeficiente de variação dos oito campos avaliados foi inferior a 15 %.

O sistema CASA possuía um microscópio de contraste de fase com objetiva de 20× (Olympus CX41; Olympus, Hamburgo, Alemanha), sendo equipado com um adaptador para câmera (Olympus 0.5X; Olympus, Hamburgo, Alemanha), uma

câmera de vídeo (preta e branca; RCA model TC 1910X; captura 60 frames por segundo) e uma mesa de platina aquecida (37°C).

2.3. *Delineamento experimental*

2.3.1. *Classificação dos reprodutores pela capacidade de preservação da motilidade espermática durante o armazenamento*

Ejaculados de 32 reprodutores foram diluídos em *Beltsville Thawing Solution* (BTS; diluente de curta ação – 3 dias; Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) e a motilidade progressiva (MP) foi avaliada ao 5º dia de armazenamento a $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada reprodutor teve três ejaculados coletados em semanas consecutivas (uma coleta por semana), incluindo análises de morfologia espermática de todos os ejaculados como critério para exclusão. Baseado na coleta semanal durante esse período, 12 reprodutores foram selecionados de acordo com um *ranking* da MP ao 5º dia. Seis reprodutores em ambas extremidades (baixa e alta) foram classificados: BP - baixa preservação (média – 64.5%; amplitude - 54.9% a 70.6% MP) e AP - alta preservação ao 5º dia (média – 83.9%; amplitude – 77.5% a 88.9% MP). Todos os reprodutores selecionados como BP tiveram a MP ao 3º dia inferior a 73% e no grupo AP apresentaram MP maior que 80%. Dessa forma, a seleção final considerou o *ranking* da MP ao 5º dia, entretanto também foi considerado a MP ao 3º dia de armazenamento. Os demais reprodutores que não foram classificados foram excluídos devido a não pertencerem a nenhuma classe de preservação (n=13), à baixa produção de doses de sêmen (n = 4), e por apresentarem mais de 20% de defeitos morfológicos (n = 3).

2.4. *Processamento dos ejaculados após a classificação dos reprodutores*

Posterior a seleção dos reprodutores, seis ejaculados de cada macho coletados semanalmente foram diluídos em *split sample* em BTS e Androstar® Plus (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) em um arranjo fatorial 2x2. Todos os ejaculados foram isotermicamente diluídos em uma etapa, produzindo doses com 1.5×10^9 espermatozoides totais, em um volume de 50 mL e envasadas em tubo flexível transparente (QuickTip Flexitubes®, Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Após a diluição as doses foram estabilizadas em temperatura ambiente controlada (22 - 24°C) durante 90 minutos sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração a $17^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2.5 Análise do sêmen

O Sistema CASA foi utilizado para avaliar a motilidade espermática *in natura*, e a motilidade de doses nos dias 1, 3, 5 e 10 após a diluição. Para estas avaliações as doses foram homogeneizadas no mínimo cinco vezes e uma amostra de 1,0 mL foi incubada a 38 °C em blocos de metal por 10 min. Após esse período realizou-se nova homogeneização e uma amostra de 3 µl que foi alíquotada por fluxo capilar em um slide da câmara de contagem(Leja®), conforme explicado anteriormente. Todas as amostras foram avaliadas pelo mesmo técnico e o método de manipulação da amostra seguiu o mesmo protocolo ao longo de todo estudo. Além disso, para evitar a avaliação incorreta pelo CASA dos parâmetros espermáticos das amostras de doses inseminantes, partículas e artefatos observados nos campos foram removidos.

O sistema CASA gerou dados referentes à motilidade total (MT), progressiva (MP) e parâmetros cinéticos que incluíam: VCL, velocidade curvilinear (µm/s); VSL, velocidade em linha reta (µm/s); VAP, velocidade média

do trajeto ($\mu\text{m/s}$); ALH, amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF, frequência com que o trajeto real cruza o trajeto médio (Hz); LIN, linearidade (VSL/VCL, %); STR, retilinearidade (VSL/VAP, %) e WOB, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio (VAP/VCL, %). As configurações do software recomendadas pela Minitüb (Tiefenbach, Alemanha) para a detecção da célula incluíam tamanho mínimo $10\ \mu\text{m}$ e o máximo $90\ \mu\text{m}$; e para motilidades as células foram consideradas como móveis (motilidade total) quando essas apresentaram mudança de orientação (AOC) superior a $2,5\ \mu\text{m}$ e foram consideradas progressivamente móveis (motilidade progressiva) quando apresentaram uma distância percorrida em linha reta (DSL) foi superior $5\ \mu\text{m}$.

A avaliação de morfologia espermática foi determinada no ejaculado *in natura* durante todo o período experimental. Uma amostra ($\sim 15\ \mu\text{L}$) de ejaculado foi alíquotada e fixada em solução de formal citrato (na concentração de 2,94%), 200 células espermáticas foram avaliadas por amostra. Na avaliação foram contabilizados defeitos de cabeça, acrossoma e peça intermediária, presença de gota citoplasmática proximal e distal, cauda enrolada, cauda dobrada e presença de formas teratológicas (PASCHOAL *et al.*, 2019). As avaliações foram realizadas em microscópio de contraste de fase (Axiostar plus, Zeiss[®], Munique, Alemanha) em aumento de $\times 1000$.

2.6. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System - SAS 9.4 (SAS[®] Institute Inc., Cary, NC, USA). As variáveis foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX. Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média. Todas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer ao nível de significância de 5%.

Para a análise das motilidades (total e progressiva) se utilizou modelos binomiais. A análise das motilidades e as cinéticas espermáticas (VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF) foram realizadas como medidas repetidas. Em relação ao momento da análise, os momentos *in natura* e o dia 10 de armazenamento foram avaliados individualmente. O período que corresponde ao dia 1, 3 e 5 foram avaliados considerando o período de armazenamento.

Para a análise das motilidades na seleção foram considerados como efeitos fixos a classe de preservação do macho e o tempo de armazenamento. Para a análise das características espermáticas na pós-seleção dos reprodutores, foram considerados como efeitos fixos a classe de preservação do macho, o diluente e o tempo de armazenamento. A coleta entrou no modelo como efeito aleatório em ambos os modelos.

3. Resultados

A motilidade progressiva no dia 5 de armazenamento em BTS (Figura 1) durante o período de seleção foi significativamente inferior ($P < 0,01$) em reprodutores BP comparados à reprodutores AP (65,3 % vs. 84,5%, respectivamente). No período de pós-seleção essa mesma diferença ($P < 0,01$) continuou a ser observada em relação aos reprodutores BP vs. AP (69,3% vs. 83,2%, respectivamente).

No ejaculado *in natura* (Figuras 2A e 2B, respectivamente) os reprodutores AP foram superiores em relação aos BP quanto a MT ($96,5 \pm 1,0$ vs. $92,9 \pm 0,5$ %; $P < 0,01$) e MP ($90,4 \pm 1,0$ vs. $83,1 \pm 0,8$ %; $P < 0,01$). Não houve interação entre classe do reprodutor, diluente e tempo de armazenamento ($P \geq 0,80$); e também não foi observado efeito da interação entre a classe do reprodutor e o diluente ($P \geq 0,24$).

Nas doses de sêmen houve interação entre a classe do reprodutor e tempo de armazenamento ($P < 0,05$) para MT, sendo que os reprodutores AP foram superiores aos BP no dia 1 ($94,1 \pm 0,3$ vs. $88,6 \pm 0,6$ %), 3 ($92,8 \pm 0,4$ vs. $87,9 \pm 0,6$ %) e 5 ($92,2 \pm 0,4$ vs. $86,3 \pm 0,7$ %) de armazenamento. Também na MP das doses de sêmen, houve interação entre diluente e tempo de armazenamento ($P = 0,05$), em que as doses de sêmen diluídas no diluente de longa ação apresentaram MP superior as doses diluídas no diluente de curta ação no dia 1 ($83,8 \pm 0,8$ vs. $80,5 \pm 0,9$ %), 3 ($81,2 \pm 0,9$ vs. $79,5 \pm 0,9$ %) e 5 ($80,7 \pm 0,9$ vs. $76,9 \pm 1,0$ %). Para a MT e MP não houve interação entre a classe do reprodutor e diluente ($P \geq 0,286$). A MT não apresentou efeito da interação entre diluente e armazenamento ($P \geq 0,19$) e a MP não demonstrou ser afetada pela interação entre classe do reprodutor e tempo de armazenamento ($P \geq 0,24$).

No dia 10 de armazenamento, a MT e a MP dos reprodutores AP foram superiores aos BP ($88,6 \pm 1,3$ vs. $75,6 \pm 2,3$ %; $P < 0,01$; $77,3 \pm 1,3$ vs. $56,3 \pm 2,8$ %; $P < 0,01$; Figura 3A e 3B). Quanto a MT e a MP o diluente de longa ação foi superior ao de curta ação ($84,5 \pm 1,6$ vs. $81,7 \pm 1,9$; $P < 0,01$; $69,4 \pm 2,4$ vs. $65,9 \pm 2,5$; $P < 0,01$).

Em relação a cinética espermática (Tabela 1) não houve interação entre classe do reprodutor, diluente e tempo de armazenamento ($P \geq 0,22$). Os parâmetros VCL, VSL, VAP, BCF, LIN, STR e WOB não foram afetados pela interação classe do reprodutor e diluente ($P \geq 0,18$). Para a interação entre a classe do reprodutor e diluente somente a variável ALH foi afetada ($P \leq 0,02$), sendo doses de sêmen em diluentes de curta ação oriundas de reprodutores AP ($3,52 \pm 0,04$), melhores que doses de sêmen de reprodutores BP independente do diluente utilizado ($3,30 \pm 0,04$ e $3,24 \pm 0,04$; diluentes de longa e curta ação, respectivamente).

Para as variáveis ALH, LIN, STR e WOB houve interação entre classe do reprodutor e tempo de armazenamento ($P \leq 0,03$). Ao considerar a interação do diluente e tempo de armazenamento para as variáveis VSL, LIN, STR e WOB, efeito significativo foi observado ($P \leq 0,04$). Os parâmetros VCL, VSL, VAP e BCF apresentaram efeitos individuais em relação a classe do reprodutor ($P < 0,01$). Doses de sêmen de reprodutores AP apresentaram maiores valores de VCL ($139,0 \pm 1,9$ vs. $127,4 \pm 1,9 \mu\text{m/s}$), VSL ($50,4 \pm 0,6$ vs. $45,6 \pm 0,6 \mu\text{m/s}$), VAP ($77,8 \pm 1,0$ vs. $70,1 \pm 1,0 \mu\text{m/s}$) e BCF ($35,1$ vs. $32,8 \pm 0,2 \text{ Hz}$) comparados a reprodutores BP. Além disso a BCF foi afetada pelo diluente utilizado ($P < 0,001$), sendo que doses de sêmen diluídas em diluentes de longa ação apresentaram maiores valores de BCF ($34,6$ vs. $33,5 \pm 0,2 \text{ Hz}$) em relação aos diluentes de curta ação.

Em relação a avaliação destes parâmetros no dia 10 de armazenamento houve interação entre a classe do reprodutor e diluente para as variáveis LIN e WOB ($P \leq 0,02$). Entretanto, as variáveis VCL, VSL, VAP, BCF e ALH apresentaram efeito individual da classe do reprodutor, em que de maneira geral os reprodutores AP foram superiores aos BP. O BCF apresentou efeito individual do diluente ($P < 0,04$), em que o diluente de longa ação foi superior ao de curta ação ($32,6$ vs. $30,9 \pm 0,5 \text{ Hz}$).

4. Discussão

A aprovação dos ejaculados frente a critérios quali e quantitativos é essencial para otimizar o desempenho reprodutivo com o uso da inseminação artificial, tornando assim o reprodutor ainda mais importante no sistema de produção. Atualmente, o sistema CASA passou a ser o método mais utilizado para realizar a avaliação da motilidade. Essa tecnologia possibilita uma avaliação mais precisa, objetiva e replicável da motilidade e da cinética espermática (BROEKHUIJSE

et al., 2012). Nas CPS muitas características espermáticas são utilizadas para verificar a qualidade do ejaculado. Contudo estas avaliações do ejaculado *in natura*, apesar de apresentarem padrões mínimos de qualidade, nem sempre conseguem inferir a fertilidade do reprodutor. Por outro lado, a avaliação da dose inseminante ao longo do armazenamento tem sido associada com fertilidade (JUONALA *et al.*, 1998; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006; FOXCROFT *et al.*, 2008), podendo assim ser um método para ranquear os reprodutores em relação a fertilidade.

A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado nas centrais para as análises da qualidade seminal. No presente estudo, avaliamos a motilidade espermática progressiva no 5º dia de armazenamento e foi possível observar duas classes distintas de reprodutores: os de baixa preservação e os alta preservação. Em estudos anteriores essa diferença na capacidade de manutenção da qualidade espermática durante o armazenamento, entre diferentes reprodutores, já havia sido relatada porém havia sido pouco estudada (PAULENZ *et al.*, 2000; KOMMISRUUD *et al.*, 2002; DE AMBROGI *et al.*, 2006; ESTIENNE *et al.*, 2007; BIELAS *et al.*, 2017). O estudo elaborado por Reis *et al.* (2002) e posteriormente por De Lazari *et al.* (2019), identificaram reprodutores “mais” e “menos” resistentes ao resfriamento a 17°C através da avaliação da motilidade total ao longo de 7 dias. Contudo, no estudo de Reis *et al.* (2002) a classificação foi baseada na observação da repetibilidade quanto a característica de manutenção da MT em cinco coletas por reprodutor, enquanto no estudo de De Lazari *et al.* (2019) foram utilizados aproximadamente dois ejaculados por reprodutor e validação da identificação foi através de análise por *cluster*. Diferente dos outros estudos citados que observaram o parâmetro de motilidade total, neste estudo utilizamos o parâmetro de motilidade progressiva, devido a esse parâmetro demonstrar os espermatozoides que apresentam maior movimento linear (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012). Neste estudo, para a realização da

classificação dos reprodutores utilizou-se três ejaculados por reprodutor e constatamos que os reprodutores BP, apresentaram maior variação na MP (CV = 15%), enquanto os reprodutores AP demonstraram um padrão mais estável de MP no 5º dia (CV = 6%). Além disso, foi possível observar que, reprodutores AP apresentaram motilidade superior em todos os momentos observados, sendo que esses machos apresentaram capacidade de manter a motilidade total e progressiva acima de 80 %, independente do diluente utilizado, enquanto os reprodutores BP apresentaram uma grande redução ao longo do período de armazenamento. Essa característica, ligada a manutenção da motilidade espermática, foi similar ao observado nos estudos já citados (REIS *et al.*, 2002; DE LAZARI *et al.*, 2019).

Uma possível explicação para a diferença entre os reprodutores, quanto a manutenção da motilidade espermática, pode estar relacionada com a sensibilidade ao resfriamento, visto que o espermatozoide suíno é altamente susceptível ao dano causado pelo resfriamento (SCHULZE *et al.*, 2018). Esta maior sensibilidade tem relação com o alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e a baixa concentração de colesterol na membrana plasmática (GACZARZEWICZ *et al.*, 2015), que por sua vez, gera uma redução na fluidez da membrana (JOHNSON *et al.*, 2000), a qual poderia explicar uma maior sensibilidade ao resfriamento (TONIOLLI *et al.*, 2017). Essa desestabilização da membrana compromete a viabilidade espermática e reduz a habilidade de fertilização do espermatozoide (YESTE, 2017). Além disso, sabe-se que reprodutores com baixa motilidade apresentam redução do colesterol e ácido docosahexaenóico (ômega-3) na membrana plasmática (AM-IN *et al.*, 2011), o qual pode ter contribuído para a pior manutenção da motilidade espermática para os reprodutores BP. Além disso, outra possível causa, para essa diferença entre os reprodutores, parece estar ligada às proteínas do plasma seminal. Reprodutores que

apresentaram maior resistência ao resfriamento demonstraram maior expressão das proteínas espermedesina PSP-I, catepsina -B, precursor da proteína E1, secretora epididimal (NPC2) e IgG Fc, proteína de ligação (DE LAZARI *et al.*, 2019). Infere-se que a proteína PSP-I atuaria estabilizando a fluidez da membrana espermática enquanto a NPC2 teria a função de manter a homeostase intracelular do colesterol, contribuindo para uma maior proteção dos espermatozoides (DE LAZARI *et al.*, 2019).

Além da avaliação da motilidade da célula espermática, no presente estudo, avaliamos as características de movimento espermático (VAP, VSL, VCL, BCF, ALH, LIN, STR e WOB) através do sistema CASA. Os reprodutores AP, mantiveram os níveis de VCL, VSL, VAP e BCF mais estáveis do que os reprodutores BP, ao longo do período de armazenamento. As análises de cinética espermática usando o sistema CASA têm demonstrado associações positivas e negativas com taxa de parto e total de nascidos (HOLT *et al.*, 1997; BROEKHUIJSE *et al.*, 2012; WINTERS *et al.*, 2018; FAIR & ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, 2019). Por outro lado, de acordo com Broekhuijse *et al.* (2012); Tremoen *et al.* (2018) as variáveis VSL, VCL e BCF apresentaram associação negativa da com tamanho de leitegada e taxa de parto. De fato Kummer *et al.* (2013) demonstraram que é possível utilizar tais características de movimento espermático como uma forma de discriminar ejaculados menos férteis, visto que os autores observaram que algumas características (VSL, VCL e ALH) apresentam poder discriminatório quando compara-se grupos de reprodutores que apresentam alta taxa de parto (97,9%) e nascidos totais (14,1) versus reprodutores com baixa taxa de parto (88,3%) e nascidos totais (11,9). Assim, as variáveis de velocidade poderiam auxiliar na classificação dos reprodutores.

Outra característica associada a fertilidade é a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), que tem importante relação com a motilidade e com a penetração da zona pelúcida (JUNG *et al.*, 2015) e parece ser mais expressa durante a capacitação espermática (GADEA, 2005). Foi observado por Kwon *et al.* (2015), que reprodutores com maiores tamanhos de leitegadas apresentaram maiores valores de ALH após a capacitação espermática do que reprodutores com menor tamanho de leitegada. No presente estudo, apesar de existir diferenças estatísticas para a característica ALH entre os grupos avaliados, os valores são muito próximos e, portanto, isso poderia não ter nenhum efeito biológico representativo. De maneira geral, quanto maiores os valores para as velocidades espermáticas (AMANN & KATZ, 2004) e menores valores de BCF e ALH na dose de sêmen para IA (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012; FAIR & ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, 2019) melhores resultados *in vivo* podem ser esperados. Devido as características observadas nas células espermáticas de reprodutores classificados como AP, é possível inferir que os espermatozoides dos reprodutores estariam mais aptos a mover-se através do muco do oviduto e atravessar as barreiras como a junção útero-tubária quando comparados às células espermáticas de reprodutores classificados como BP (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012; WINTERS *et al.*, 2018).

A motilidade total, progressiva e os parâmetros de cinética espermática demonstraram redução ao longo do período de armazenamento, para ambas as classes de reprodutores e tipo de diluente, e essa redução ao longo do tempo de armazenamento já havia sido relatada em outros estudos (DUBÉ *et al.*, 2004; DE AMBROGI *et al.*, 2006). Essa redução pode estar relacionada ao tempo de armazenamento que leva à alterações estruturais, funcionais e processos oxidativos nas membranas celulares e danos à integridade do DNA (BIELAS *et al.*, 2017). Essas

alterações reduzem a fertilidade do espermatozoide durante o tempo de armazenamento (KUMARESAN *et al.*, 2009). Além disso, essas alterações funcionais relacionadas ao envelhecimento parecem ser um processo fisiológico (JOHNSON *et al.*, 2000). Entretanto, é interessante ressaltar que os reprodutores AP apresentaram melhor capacidade de manter a qualidade espermática durante todo o período de armazenamento, enquanto os reprodutores BP demonstraram ser mais afetados pelo efeito deletério do envelhecimento celular.

Para a redução dos efeitos negativos citados acima, tem-se desenvolvido diluentes cada vez mais complexos. Muitos estudos (WATERHOUSE *et al.*, 2004; DE AMBROGI *et al.*, 2006; ESTIENNE *et al.*, 2007; KAEOKET *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2015) demonstram que estes diluentes são enriquecidos com protetores de membranas e substratos que podem promover a manutenção da qualidade seminal durante o período de armazenamento. Neste estudo utilizamos dois tipos de diluentes, categorizados como: curta (até 3 dias) e longa (até 7 dias) ação. Contudo, não observamos interação entre os reprodutores e os diluentes sobre a MT e MP, mas houve efeito individual do diluente sobre essas variáveis. No geral era esperado que o diluente de longa ação fosse melhor que o diluente de curta ação, devido aos ingredientes como: sistemas complexos de tamponamento (TRIS, TES, HEPES, MOPS), protetores de membrana (albumina de sérica bovina) e antioxidantes (L-cisteína, glutatona, resveratrol, α -tocoferol, selênio e vitamina E) (SUTOVSKY, 2015; YESTE, 2017; PEZO *et al.*, 2018); os quais poderiam beneficiar os reprodutores BP, contudo tal efeito não foi observado.

Em nosso estudo demonstramos que existe diferença entre os reprodutores em relação a manutenção da motilidade espermática durante o armazenamento. É interessante observar que os reprodutores BP mantiveram a MT acima de 60 %, a qual seria o valor de MT mínimo requerido para utilização da dose na IA (FLOWERS,

1997). No entanto, as células espermáticas dos reprodutores BP demonstraram sofrer mais com o resfriamento a 17°C durante o armazenamento. Assim na rotina prática das centrais utilizando somente as informações de MT não seria possível detectar problemas de fertilidade a essa classe de reprodutores. Porém quando analisamos os parâmetros de movimento como um todo, os reprodutores BP apresentaram de fato, uma queda substancial dos parâmetros de movimentos analisados e a redução destas características de movimento poderiam influenciar o desempenho reprodutivo desses animais, quando submetidos a testes com maior desafio de avaliação da fertilidade *in vivo*.

5. Conclusão

Os reprodutores classificados no 5º dia de armazenamento como de alta preservação, apresentam melhor manutenção dos parâmetros de motilidade e cinética espermática durante o armazenamento, independente do uso de diluentes de curta ou longa duração.

Conflito de interesses

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesses para declarar.

Agradecimentos

Os autores são gratos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil), Agroceres PIC Brasil pelo apoio financeiro e a Master Agroindustrial por fornecer as instalações para realizar este estudo.

Referências

AM-IN, N. *et al.* Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**. v. 75, n. 5, p. 897-903, 2011. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.10.032

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. DOI:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x

BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 36, n. Supl 1, p. 5-16, 2008.

BIELAS, W. *et al.* Effect of long-term storage in Safe Cell+ extender on boar sperm DNA integrity and other key sperm parameters. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 59, n. 1, p. 58, 2017. DOI:10.1186/s13028-017-0325-9

BROEKHUIJSE, M. *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. DOI:10.2527/jas.2011-4311

DE AMBROGI, M. *et al.* 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, n. 5, p. 543-552, 2006. DOI:10.1111/j.1365-2605.2006.00694.x

DE LAZARI, F. L. *et al.* Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17°C. **Theriogenology**. 2019. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.11.023

DUBÉ, C. *et al.* Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**. v. 62, n. 5, p. 874-886, 2004. DOI:10.1016/j.theriogenology.2003.12.006

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

FAIR, S.; ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J. Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation. **Theriogenology**. v. 137, p. 15-22, 2019. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.032

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

FOXCROFT, G. *et al.* Identifying useable semen. **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p. 1324-1336, 2008. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.07.015

GACZARZEWICZ, D. *et al.* Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. **Turkish Journal of Biology**. v. 39, n. 4, p. 582-594, 2015. DOI:10.3906/biy-1412-76

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**. v. 63, n. 2, p. 431-444, 2005. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.09.023

HENNING, H. *et al.* Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 26, n. 5, p. 623-632, 2014. DOI:10.1071/RD13113

HOLT, C. *et al.* Objectively Measured Boar Sperm Motility Parameters Correlate With the Outcomes of On-Farm Inseminations: Results of Two Fertility Trials. **Journal of Andrology**. v. 18, n. 3, p. 312-323, 1997. DOI:10.1002/j.1939-4640.1997.tb01925.x

JOHNSON, L. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**. v. 62, n. 1, p. 143-172, 2000. DOI: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, n. S2, p. 20-24, 2015. DOI: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. DOI:10.1111/j.1439-0531.1998.tb01334.x

KAEOKET, K. *et al.* Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. v. 40, n. 3, p. 257-263, 2010.

KOMMISRUD, E. *et al.* Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 43, n. 1, p. 49, 2002. DOI:10.1186/1751-0147-43-49

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, p. 162-171, 2009. DOI:10.1016/j.anireprosci.2008.01.006

KUMMER, A. *et al.* Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 48, n. 5, p. 747-754, 2013. DOI:10.1111/rda.12155

KWON, W.-S. *et al.* Increased male fertility using fertility-related biomarkers. **Scientific Reports**. v. 5, n. 1, p. 15654, 2015. DOI:10.1038/srep15654

PASCHOAL, A. F. L. *et al.* Use of testicular tone and echogenicity in identifying boars with low sperm quality. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 71, p. 1277-1285, 2019. DOI:10.1590/1678-4162-10860.

PAULENZ, H.; KOMMISRUUD, E.; HOFMO, P. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 35, n. 2, p. 83-87, 2000. DOI:10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x

PEZO, F. *et al.* Preservation of boar semen: An update. **Reproduction in Domestic Animals**. 2018. DOI:10.1111/rda.13389

REIS, G. R. *et al.* Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 30, n. 3, p. 159-166, 2002. DOI:10.22456/1679-9216.17225

ROCA, J. *et al.* Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. S2, p. 48-55, 2015. DOI:10.1111/rda.12530

RUIZ-SANCHEZ, A. L. *et al.* The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**. v. 66, n. 4, p. 736-748, 2006. DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.12.012

SCHULZE, M. *et al.* Effect of production management on semen quality during long-term storage in different European boar studs. **Animal Reproduction Science**. v. 190, p. 94-101, 2018. DOI:10.1016/j.anireprosci.2018.01.011

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. **Animal Reproduction Science**. v. 110, n. 3, p. 335-346, 2009. DOI:10.1016/j.anireprosci.2008.01.024

SUTOVSKY, P. New approaches to boar semen evaluation, processing and improvement. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. S2, p. 11-19, 2015. DOI:10.1111/rda.12554

TEIXEIRA, S.; CHAVEIRO, A.; MOREIRA DA SILVA, F. The effects of three extenders on refrigerated boar semen. **South African Journal of Animal Science**. v. 45, n. 1, p. 82-88, 2015. DOI:10.4314/sajas.v45i1.10

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D. B.; BARROS, T. B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelação em ejaculados de diferentes varrões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. p. 297-311, 2017.

TREMOEN, N. H. *et al.* Relationship between sperm motility characteristics and ATP concentrations, and association with fertility in two different pig breeds. **Animal Reproduction Science**. v. 193, p. 226-234, 2018. DOI:10.1016/j.anireprosci.2018.04.075

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Can external quality control improve pig AI efficiency? **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p. 1346-1351, 2008. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.06.006

WABERSKI, D. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. **Theriogenology**. v. 137, p. 2-7, 2019. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.030

WATERHOUSE, K. *et al.* Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**. v. 62, n. 9, p. 1638-1651, 2004. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.03.001

WINTERS, R. A. *et al.* Porcine sperm binding to oviduct cells and glycans as supplements to traditional laboratory semen analysis1. **Journal of Animal Science**. v. 96, n. 12, p. 5265-5275, 2018. DOI:10.1093/jas/sky372

XU, X. *et al.* In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**. v. 76, n. 12, p. 3079-3089, 1998. DOI:10.2527/1998.76123079x

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. **Animal Reproduction**. v. 14, n. 1, p. 69-81, 2017. DOI:10.21451/1984-3143-AR895

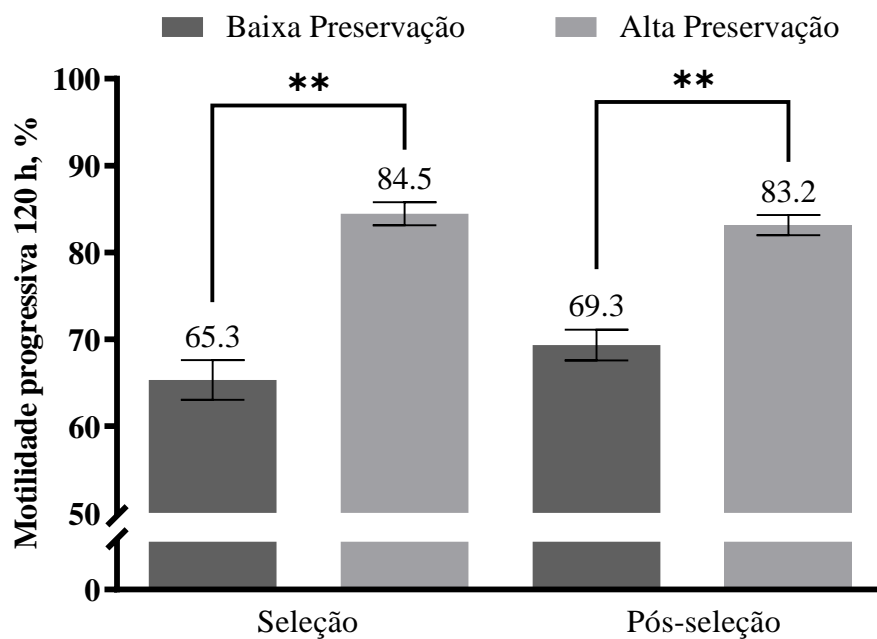


Figura 1. Motilidade progressiva de doses de sêmen diluídas em BTS de reprodutores classificados como alta e baixa preservação nas 120 h de armazenamento a 17 °C no período da seleção e pós-seleção dos reprodutores.

** P<0,001.

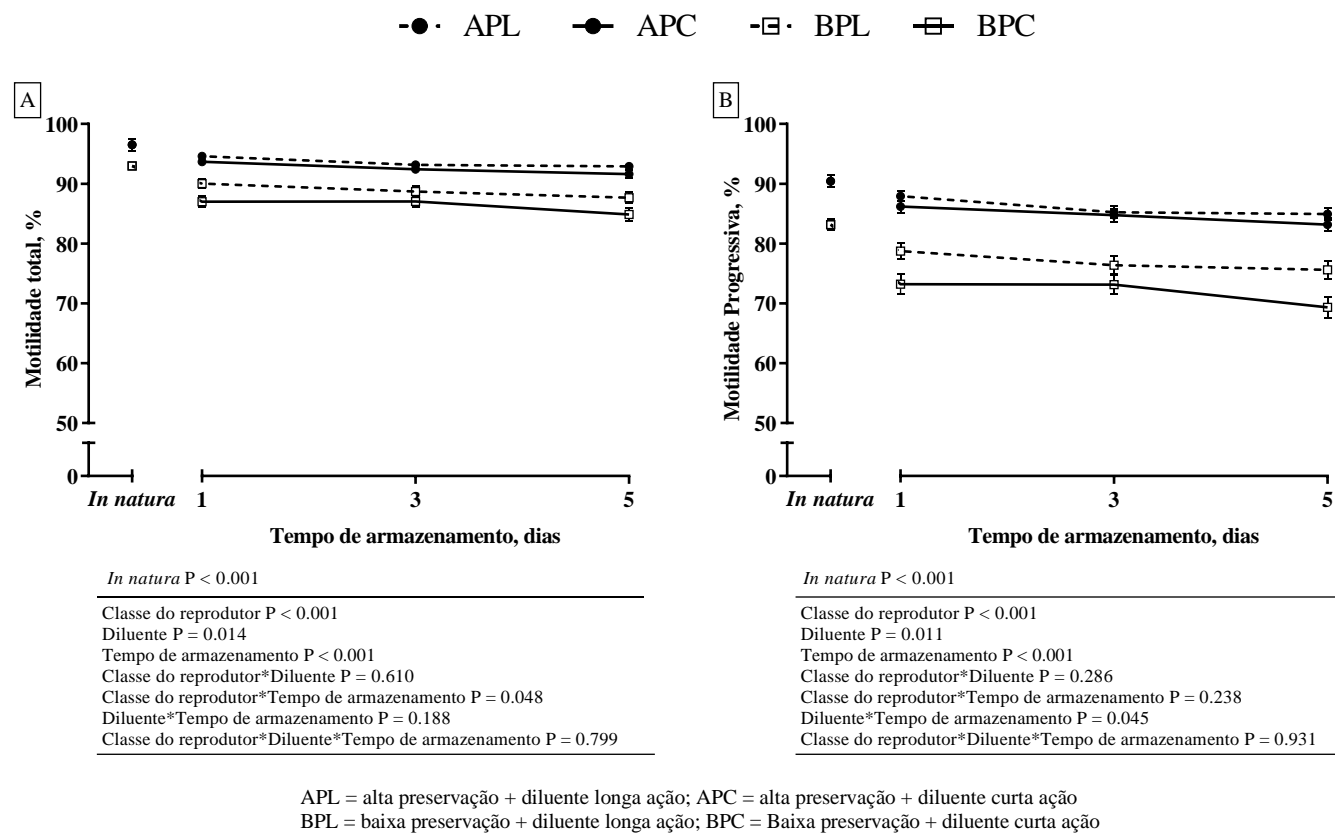
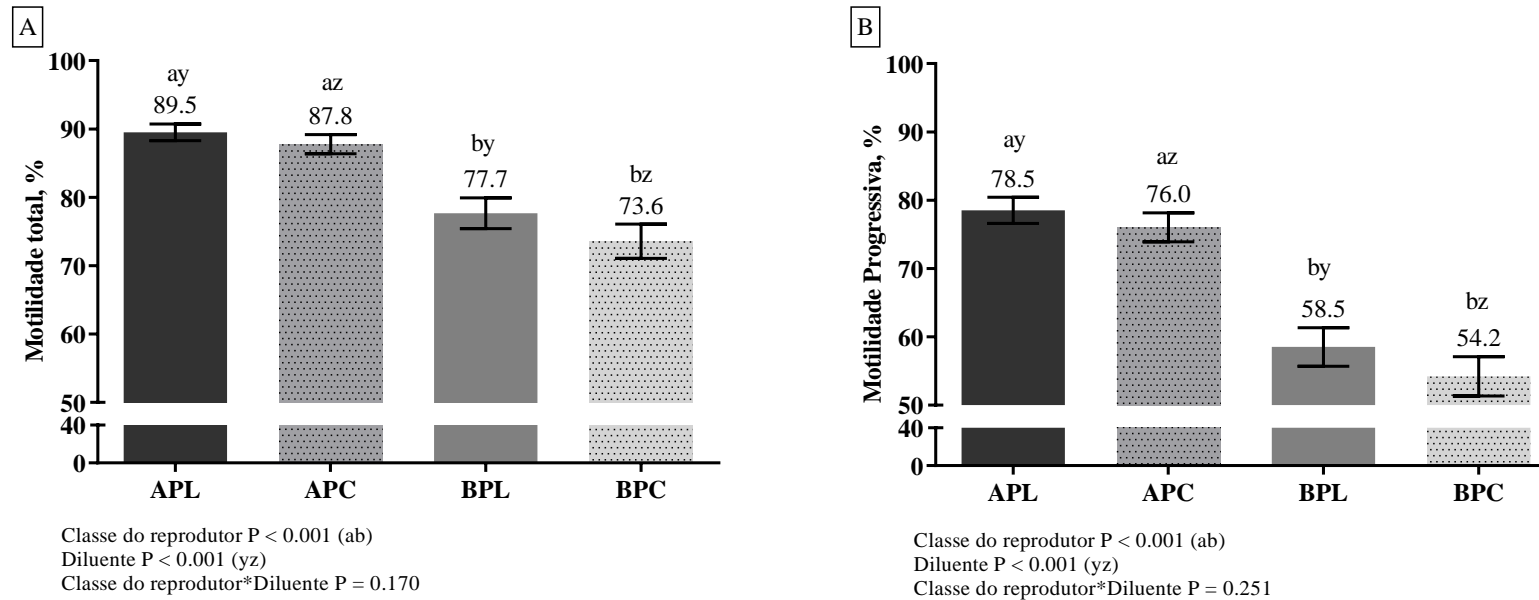


Figura 2. Motilidade espermática total (A) e progressiva (B) de doses de sêmen dos machos classificados como alta e baixa preservação diluídas em diluentes de curta e longa ação durante 5 dias de armazenamento a 17 °C.



APL = alta preservação + diluente longa ação; APC = alta preservação + diluente curta ação
 BPL = baixa preservação + diluente longa ação; BPC = Baixa preservação + diluente curta ação

Figura 3. Motilidade espermática total (A) e progressiva (B) de doses de sêmen dos machos classificados como alta e baixa preservação diluídas em diluentes de curta e longa ação no dia 10 de armazenamento a 17 °C.

Tabela 1. Características espermáticas de doses de sêmen dos machos classificados como alta e baixa preservação diluídas em diluentes de curta e longa ação durante o período de armazenamento a 17 °C.

Variáveis	Baixa preservação		Alta preservação		Erro Padrão	C*D*T	C*D	C*T	D*T	C	D	T
	Curta ação	Longa ação	Curta ação	Longa Ação								
VCL, $\mu\text{m/s}$												
Dia 1	126,09	129,61	136,10	137,45								
Dia 3	127,21	133,56	140,83	139,94	3,30	0,407	0,183	0,097	0,987	<0,001	0,311	0,037
Dia 5	119,41	128,53	141,58	138,53								
Dia 10*	107,81	116,74	139,93	139,00	4,41	-	0,219	-	-	<0,001	0,318	-
VSL, $\mu\text{m/s}$												
Dia 1	42,55	46,31	47,63	51,83								
Dia 3	45,12	47,36	50,17	51,50	1,02	0,219	0,494	0,651	0,044	<0,001	<0,001	<0,001
Dia 5	44,25	48,48	50,23	51,32								
Dia 10*	40,86	42,99	50,98	53,07	1,98	-	0,988	-	-	<0,001	0,192	-
VAP, $\mu\text{m/s}$												
Dia 1	67,74	71,10	75,17	78,17								
Dia 3	70,00	73,18	78,23	78,85	1,76	0,332	0,341	0,324	0,697	<0,001	0,108	0,020
Dia 5	66,78	71,79	78,80	78,15								
Dia 10*	61,11	64,95	77,38	78,72	3,05	-	0,606	-	-	<0,001	0,287	-

Continua

BCF, Hz													
Dia 1	31,81	33,42	34,38	36,24									
Dia 3	32,61	33,76	34,91	35,70	0,45	0,250	0,506	0,364	0,204	<0,001	<0,001	0,120	
Dia 5	31,79	33,75	34,60	35,18									
Dia 10*	28,60	30,59	33,35	34,64	0,80	-	0,638	-	-	<0,001	0,036	-	
ALH, μm													
Dia 1	3,31	3,31	3,46	3,30									
Dia 3	3,28	3,38	3,53	3,38	0,05	0,510	0,015	0,001	0,564	<0,001	0,277	0,012	
Dia 5	3,13	3,22	3,56	3,37									
Dia 10*	3,15	3,19	3,62	3,52	0,06	-	0,316	-	-	<0,001	0,678	-	
STR, %													
Dia 1	62,47	64,94	63,17	66,03									
Dia 3	64,25	64,44	63,83	65,14	0,70	0,878	0,470	0,002	0,024	0,568	0,002	0,001	
Dia 5	66,00	67,19	63,61	65,67									
Dia 10*	66,63	66,00	65,33	67,17	0,82	-	0,140	-	-	0,939	0,466	-	

Continua

LIN, %													
Dia 1	33,50	35,44	34,61	37,44									
Dia 3	35,50	35,25	35,36	36,61	0,54	0,841	0,164	0,035	0,002	0,361	0,002	0,019	
Dia 5	36,86	37,25	35,25	36,89									
Dia 10*	37,58	36,37	35,83	37,75	0,67	-	0,023	-	-	0,782	0,601	-	
WOB, %													
Dia 1	53,28	54,50	54,83	56,50									
Dia 3	54,89	54,50	55,14	55,92	0,45	0,731	0,223	0,005	0,020	0,012	0,070	0,01	
Dia 5	55,61	55,42	55,19	56,00									
Dia 10*	56,25	54,79	54,79	56,04	0,79	-	0,010	-	-	0,840	0,840	-	

Classe do reprodutor (C), Diluente (D); Tempo de armazenamento (T);

* A análise realizada considerando este momento isolado;

Características avaliadas pelo sistema CASA: VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade média do trajeto; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência com que o trajeto real cruza o trajeto médio; STR, retilinearidade (VSL/VAP); LIN, linearidade (VSL/VCL); e WOB, oscilação do trajeto real em relação ao trajeto médio (VAP/VCL),

CAPÍTULO III – SEGUNDO MANUSCRITO

*DIFFERENT BOAR CLASSES BASED ON PROGRESSIVE SPERM MOTILITY
AT 120 H OF STORAGE AFFECT FERTILITY WHEN USING A SINGLE
FIXED-TIME INSEMINATION*

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO
THERIOGENOLOGY

(de acordo com as normas do periódico)

**Different boar classes based on progressive sperm motility at 120 h of storage
affect fertility when using a single fixed-time insemination**

M.S. Lucca¹, R.D.F. Gianluppi^a, A.P.G. Mellagi^a, I. Wentz^a, F.P. Bortolozzo^a, R.R.

Ulguim^{a*}

Abstract

The aim of the study was to evaluate the fertility of boars classified by progressive sperm motility (PM) at 120 h of storage using semen doses diluted in short- or long-term extenders for single fixed-time insemination. Twelve boars were previously classified in low- (64.5%) and high-preservation (83.9%) capacity for maintaining the PM at 120 h, using short-term extender and storage at $17 \pm 1^\circ\text{C}$. A total of 519 weaned sows (2×2 factorial design) were single inseminated 24 h after ovulation induction with triptorelin (OvuGel[®]). The PM at insemination was affected by the interaction of the class of boars and type of extender ($P < 0.001$). The pregnancy rate (PR), farrowing rate (FR), and total piglets born (TPB) were not affected ($P \geq 0.163$) by the interaction of the class of boars and extender. However, low-preservation boars presented lower TPB (14.1 ± 0.2) compared to high-preservation boars (15.0 ± 0.2 ; $P < 0.01$). The PR and FR were not affected by the class of boars ($P \geq 0.187$). The type of extender did not affect PR, FR, and TPB ($P \geq 0.440$). In a group of 397 sows the effect of storage time at insemination (24 or 72 h) was included (2×2×2 factorial design). The PM was not affected ($P \geq 0.677$) by the interaction of the class of boar, type of extender, and storage time. However, an interaction of class of boars and storage time was observed ($P < 0.001$).

¹ Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Setor de Suínos. Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. E-mail address: rafael.ulguim@ufrgs.br (R.R. Ulguim).

Ejaculates from high-preservation boars at 24 h had higher PM ($87.4 \pm 1.1\%$) compared to high-preservation boars at 72 ($83.4 \pm 1.3\%$) and with low-preservation boars at 24 ($75.7 \pm 1.7\%$) or 72h ($72.8 \pm 1.9\%$). The PR, FR, and TPB were not affected ($P \geq 0.527$) by the interaction of class of boars, type of extender and storage time. An interaction between the class of boar and storage time ($P = 0.049$) was observed for TPB. Females inseminated with semen doses from the low-preservation boars with 72 h presented fewer piglets (13.6 ± 0.4) compared to the use of semen doses from high-preservation boars at 24 (15.2 ± 0.4) or 72 h (15.5 ± 0.4). This difference was not observed for the low-preservation boars at 24 h (14.9 ± 0.4) compared to 72 h of storage ($P = 0.218$). In conclusion, the low-preservation boars had a reduced TPB. Single insemination of sows with semen doses with 72 h of storage from low-preservation boars reduced TPB.

Keywords: Boar fertility, type of extender, storage time, total piglets born

1. Introduction

The relation between sperm quality and *in vivo* performance could be used as an indicator of the fertility of boars [1]. In the routine of the boar studs, *in vitro* evaluation of semen is daily assessed to determine sperm concentration, motility, and morphology [2]. These parameters provide an estimative of the relative fertility of boars [3] allowing the classification of ejaculates in able or not for insemination [4], especially the sperm motility is one of the leading indicators of sperm cells quality and most commonly associated with preservation capacity and fertility [5]. Even though it is important to consider the sperm motility to eliminate visible poor-quality ejaculates, this sperm trait is poorly correlated with the *in vivo* fertility when stored boar semen is used. [6, 7]. It happens because this sperm trait is referred to

be compensable, and sometimes the impact on reproductive performance is not observed due to the use of additional sperm cells in the semen dose. For these reasons, there is a difficulty in establishing methods for performing the screening of boars for fertility, based on motility in practical conditions.

Several studies have been evaluating alternatives to identify fertility of boars through the association of some factors with *in vivo* evaluation, such as sperm motility during storage and a low number of sperm cells per insemination; multivariate analyses of sperm traits using parameters of computerizing analysis systems and; the use of heterospermic semen doses followed by paternity testing [4, 8-10]. In these studies, it was possible to identify less fertile boars; however, the use of some methods is unfeasible due to cost or difficulty to perform under field conditions. The most precise methodology for mensuration of the relative fertility of boar should consider the evaluation of the farrowing rate and the total number of piglets born [11]. In commercial farms, the association between boar fertility and reproductive performance usually lacks due to the use of multiple inseminations by different boars and/or the compensable number of sperm cells in the doses. In this way, the use of single fixed-time insemination (FTAI) with homospermic semen doses and using a reduced number of sperm cells, could be used to circumvent these problems allowing to assess differences among boars on-field fertility and the quick detection of less fertile boars [12]

It is well established the occurrence of boars with reduced capacity in maintaining higher sperm motility during storage time [13-15]. The capacity for preserving sperm cells during storage time could be used to predict the fertility of individual boars [16, 17], considering that boars with higher sperm motility at 144 and 240 h of storage showed larger litter size [8, 18]. However, the capacity for

preserving the sperm cells may be influenced by the type of extender [19-21] and storage time [5, 22, 23]. Commonly, the association of boars with reduced capacity to preserve motility with the use of different extenders and its impacts on reproductive performance to define strategies for semen processing and use for FTAI.

Even though considering the great reproductive results using a short-term extender [24], it is common in some farms, the use of long-term extenders even before three days. The reasons for this choice are unclear [25]. It is widely accepted that long-term extenders are more efficient to preserve sperm quality, fertility, and to provide sperm protection in long-distance transport [20, 26, 27]. Studies performed in the past observed a reduction in sperm motility after 48 h of storage, followed by a negative impact on reproductive performance, even though long-term extenders were used [28]. Currently, different extenders are available, and improvements in the composition certainly were included comparing to the past, although the composition of the extender may contain improved buffering and antioxidants [25].

Considering the previously discussed, it is hypothesized that the reproductive performance is reduced in boars classified as more sensitive to semen cooling during storage, semen doses from boars classified as sensitive to cooling during storage time could be better preserved in long-term extender, and the use of semen doses at 24 or 72 h of storage in long-term extender does not improve reproductive performance. Therefore, the aim of the study was to evaluate the field fertility of boars classified by progressive sperm motility at 120 h of storage (low- or high-preservation) using semen doses diluted in short- or long-term extenders. Additionally, to evaluate the effect of class of boars, type of extender when using semen doses stored for 24 or 72 h for use in a single FTAI.

2. Material and Methods

The experiment was performed in a commercial boar stud and a sow farm located in southern Brazil-Santa Catarina State, with an inventory of 88 and 5500 animals, respectively. The experiment was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (n° 34329) from the Federal University of Rio Grande do Sul.

2.1. Animals, housing and feeding

Thirty-two healthy boars (AG 337 - Agrocere PIC[®], Patos de Minas, MG, Brazil) with 19.6 ± 9.1 months of age were used. They were individually housed in stalls (2.4×0.7 m) in a temperature-controlled barn ($18 - 23$ °C). The boars were fed twice a day with a corn-soybean based diet (12.5% CP, 0.68% SID Lysine and 3.25 Mcal ME/kg) according to body condition score (BCS – 1 to 5). Boars with ≤ 3 and > 3 BCS were fed 2.4 and 2.2 kg/d, respectively. Water was provided *ad libitum*.

Crossbred weaned sows (Camborough - Agrocere PIC[®], Patos de Minas, MG, Brazil) were selected according to parity (3.2 ± 1.5 ; 1 to 7), BCS (2.8 ± 0.3 ; 2.5 to 3.5), lactation length (20.2 ± 1.1 ; 18 to 23 days), and previous total piglets born (15.6 ± 2.6 ; ≥ 9). After weaning, the sows were housed in individual crates (2.2×0.6 m) for estrus detection, breeding, and gestation. They were fed in automatic feeders with a corn-soybean diet (14% CP, 0.62% SID Lysine and 3.30 Mcal ME/kg) and *ad libitum* access to water. During the weaning-to-estrus interval, the sows were fed with 4.0 kg/d until the first insemination and then with 2.0kg/d from day 0 to 35 of gestation. After this period (36 d until the farrowing), all sows received 1.8 kg/d of the same diet.

2.2. Semen collection, processing, and assessments

Semen collection was performed once a week by the same trained technician using the glove-hand method [29]. Immediately after collection, the weight of the entire ejaculate, motility, and concentration was recorded to calculate the total number of semen doses to be produced. The ejaculates were diluted by isothermal dilution methodology using Beltsville Thawing Solution (BTS; Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) or Androstar[®] Plus (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) extenders. The semen doses were produced with 1.5×10^9 sperm cells and stored in tubes (QuickTip Flexitubes[®], Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) with a total volume of 50 mL. After the final dilution, the semen doses were stabilized for 90 min at 22°C and then stored at $17 \pm 1^\circ\text{C}$.

The sperm motility and concentration were obtained using a computer-assisted sperm analyzer – CASA system (Sperm Vision[®] 3.7; Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany). The analysis was performed with Leja-4 standardized counting chambers with a depth of 20 μm (Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, Netherlands). Beyond the analysis of the raw semen, motility parameters at 24, 72, and 120 h after the final dilution were also evaluated. For the analyses of raw semen, the sample preparation was performed in a microtube (2.0 ml; Eppendorf[®], Hauppauge, EUA) using an electronic mixing pipette for a dilution rate of 1:9 (90 μl of raw semen plus 810 μl of pre-warmed extender). The Leja counting slides were filled in a single step with a pipette set at 3 μl , no pressure was used (capillary flow of the chamber), and filling stopped when the chamber was utterly filled. Eight fields per slide, along the centerline, were analyzed at $200 \times$ magnification considering a total of 80 to 160 sperm cells counted per field. For the analyses after dilution, 1 ml of each stored semen dose was collected and incubated for 10 min in a thermal block at 38°C to determine sperm motility.

Sperm morphology was assessed using samples (~15 μ L) of raw semen fixed in a formalin-citrate solution (2.94%). On each day of collection, 200 sperm cells were evaluated and classified as: normal spermatozoa, abnormal head, acrosome defect, abnormal midpiece, attached proximal and distal cytoplasmatic droplets, folded tail, and coiled tail [30]. The evaluation was performed under phase-contrast microscopy at $\times 1000$ magnification.

2.3 Experimental design

2.3.1 Boar classification according to the sperm progressive motility at 120 h of semen dose storage

Ejaculates of thirty-two boars were extended in BTS and evaluated according to the sperm progressive motility (PM) at 120 h of storage at $17 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figure 1A). Each boar was collected once a week during three consecutive weeks. Boars with low semen production (n=4) and total sperm abnormalities higher than 20% (n=3) were excluded from the experiment. Based on these evaluations, twelve boars were selected according to the ranking of the average of PM at 120 h (Figure 1B). Six boars in both extremity (low and high) were classified as following: low-preservation at 120 h (mean – 64.5%; range - 54.9% to 70.6% PM) and high-preservation at 120 h (mean – 83.9%; range – 77.5% to 88.9% of PM). All boars selected in the low-preservation class had the PM at 72h lower than 73% and in the high-preservation class greater than 80%. Even though considering a low PM at 120 h, one boar was not selected for the low-preservation class group considering the high PM at 72 h (79.3%). In this way, the final selection has considered those boars ranked by PM at 120 h. However, it also considered the PM at 72h.

2.3.2. Fertility of sows inseminated with different classes of boars based on sperm progressive motility during storage and using different extenders

The ejaculates from the twelve boars previously selected were diluted in a split-sample basis using a short-term extender (BTS) or a long-term (Androstar® Plus) to produce semen doses to be used. Weaned sows (n=519) were randomly assigned in a factorial design (2×2) according to the following factors: two classes of boars (low- and high-preservation) and two types of extender (short- and long-term). These sows were single inseminated with semen doses with 24 h of storage. In an additional group of sows, the insemination was performed using semen doses with 72 h of storage (n=204) for comparisons with semen stored during 24 h (n=193). Thus, a 2×2×2 factorial design considering the following factors were performed: two classes of boars (low- and high-preservation), two types of extender (short- and long-term) and two storage time for semen doses used for a single insemination (24 and 72 h). The same criteria used for selection of the sows to be inseminated using semen doses with 24h of storage were used for those sows inseminated with 72 h of semen storage.

2.4. Detection of estrus and insemination protocol

Estrus detection started on the weaning day and was performed once a day (8 am) using a fence-line boar contact and the back-pressure test. The FTAI protocol was performed as follows: sows that expressed estrous up to 72 h post-weaning were excluded from the experiment. The remaining sows were treated with 200 µg of triptorelin acetate (OvuGel®, JBS United Animal Health LLC, Sheridan, USA) at 96 h post-weaning [31]; sows that presented estrus 22 - 24 h after the OvuGel® administration were single inseminated according to groups of evaluation. In all the

sows, the post-cervical insemination for deposition of the semen dose in the uterine lumen was used.

2.5. Data record

The pregnancy rate (PR), farrowing rate (FR), the total number of piglets born (TPB) were recorded. Pregnancy detection was performed at 25 days post-insemination by transcutaneous ultrasonography. The procedure was performed by the same trained technician using real-time ultrasound and convex linear transducer (A6V, SonoScape® Co. Ltda, Shenzhen, China).

2.6 Statistical analysis

All the statistical analyses were carried out using the SAS® software (SAS, version 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). All descriptive data are expressed as mean \pm standard error (SE). The different classes of boars were defined according to the ranking of average for PM, using descriptive analysis. The analysis has considered as a fixed effect the class of boar, type of extender, and their interactions (2×2 factorial design). In the $2 \times 2 \times 2$ factorial design, the analysis has considered the class of boar, type of extender, storage time, and their interactions as a fixed effect. The week was included as a random effect when fitted in the model.

Total and progressive motility at insemination were analyzed by GLIMMIX procedure in a binomial distribution. Pregnancy rate (PR) and farrowing rate (FR) were analyzed by logistic regression (GLIMMIX procedure) using a binary distribution. The total piglets born (TPB) was analyzed, assuming a normal distribution by GLIMMIX procedure and means compared by Tukey-Kramer

adjustment. The differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P \leq 0.05$).

3. Results

No differences were found among groups of evaluation, in each factorial design (2×2 or $2 \times 2 \times 2$), at the onset of the experiment for parity, BCS, lactation length and previous number of total piglets born ($P \geq 0.282$). The PM from ejaculates of the boars previously classified as low- or high-preservation at 120 h of storage in BTS during the period of *in vivo* evaluation, also showed similar responses to that observed during the period of classification of the boars (Figure 2).

The TM and PM at insemination were affected by the interaction of the class of boars and type of extender ($P < 0.001$). The ejaculates from high-preservation boars diluted in short- or long-term extender showed higher TM at insemination compared to other groups that also differed each other. Progressive motility was better in the semen doses from high-preservation boars diluted in long-term extender in comparison with other groups ($P < 0.001$). The lower PM at insemination was observed for ejaculates of low-preservation boars diluted in short-term extender compared to other groups ($P < 0.001$). The reproductive performance (PR, FR, and TPB) was not affected ($P \geq 0.163$) by the interaction of the class of boars and type of extender. However, an effect for the class of boars was observed for TPB ($P < 0.001$; Table 1). Considering the individual analysis of the factors, low-preservation boars had 0.9 fewer TPB than high-preservation boars ($P < 0.010$; Table 2). The PR and FR were not affected by the class of boar ($P \geq 0.187$). The type of extender used to produce the semen doses did not affect PR, FR, and TPB ($P \geq 0.700$; Table 2).

In the group considering the weaned sows submitted to inseminations with semen doses stored for 24 or 72 h, the total and PM were not affected ($P \geq 0.677$) by the interaction of the class of boar, type of extender and storage time (Table 3). However, ejaculates of high-preservation boars at 24 h had higher ($P < 0.001$) total and progressive motility ($94.4 \pm 0.5\%$; $87.4 \pm 1.1\%$; respectively) compared to high-preservation boars at 72 ($91.5 \pm 0.8\%$; $83.4 \pm 1.3\%$; respectively) and with low-preservation boars at 24 ($88.2 \pm 1.0\%$; $75.7 \pm 1.7\%$, respectively) or 72h ($85.7 \pm 1.3\%$; $72.8 \pm 1.9\%$, respectively). The interaction of the class of boars and type of extender for total and progressive motility at insemination was similar to the results previously cited. The reproductive performance (PR, FR, and TPB) was not affected ($P \geq 0.527$) by the interaction of class of boars, type of extender and storage time (Table 3). However, an interaction between the class of boar and storage time ($P = 0.049$) was observed for TPB. Semen doses from the low-preservation boars used at 72 h presented fewer piglets compared to the use of semen doses from high-preservation boars at 24 or 72 h. This difference ($P = 0.218$) was not observed for the low-preservation boars at 24 h compared to 72 h of storage (Figure 3).

4. Discussion

The presence of boars with low capacity for maintaining sperm motility during storage is commonly reported in the practical routine of the boar studs. However, the *in vivo* reproductive impacts and the use of this information to identify less fertile boars are poorly explored. In this study, the previous classification of boars by PM of the semen doses at 120h of storage in BTS showed reduced sperm motility at the moment of insemination for low- compared to high-preservation boars. Even though considering satisfactory motility at insemination, a negative

impact on reproductive performance was observed for the low-preservation boars, and the use of short- or long-term extenders did not improve the reproductive parameters of fertility.

The variability in the values of sperm motility during storage among different ejaculates from the same boar is a challenge to implement a method for the classification of boars [13]. This characteristic was verified in our study for the low-preservation boars in which high variation in the PM ($cv = 15\%$) in the different semen collections was observed. High-preservation boars showed a more stable pattern of PM at 120 h in different ejaculates ($cv = 6\%$). It was similar to observed by Reis et al. [13], where less sensitive boars to storage tended to show a lower variability of the total motility at 144 h [13]. Thus, based on our observations, it is possible to infer that high-preservation boars could be identified using three ejaculates; however, to better classify the low-preservation boars, it is necessary to evaluate more than nine ejaculates.

The sperm motility is widely accepted as an *in vitro* indicator of semen quality and related to boar fertility [32]. Usually, studies performed in the past have used the total sperm motility for association with the fertility of boars [6], and the results were similar to those observed in the present study when PM was used. It is essential to mention that by using a long-term extender, the PM of semen doses from the low-preservation boars had a slight improvement but not enough to influence reproductive results. The reason for differences in the capacity for maintaining sperm motility during storage in temperatures ranging from 15 to 18 °C between classes of boars is not entirely elucidated. It is speculated that damages caused by cooling during storage in low-preservation boars could be more pronounced. The aging of sperm cells could be related to the high content of polyunsaturated fatty acids and low concentration of cholesterol [33], promoting an

instability of the sperm membrane during the cooling and storage. It could impair the physicochemical characteristics of the membrane due to an alteration of the membrane fluidity [33, 34]. Besides, there is a reduction in lateral movements of the plasma membrane phospholipids, and this situation is associated with lipid-phase segregation. This functional modification causes an irreversible change in the membrane proteins, and the destabilization of the plasma membrane compromises the sperm viability and reduces the fertile ability [24]. For this reason, the use of sperm motility might be indicative of boar fertility considering the association of factors related to integrity and functionality of the sperm cell membrane during storage and the correlation between sperm motility and total piglets born [8, 18].

Homospermic semen doses with 1.5 billion sperm cells using a single FTAI was able to demonstrate a reduction on TPB for low- compared to high-preservation boars classified by PM at 120h of storage. Analysis to identify less fertile boars usually considered the boar effect without considering the association with the capability for the preservation of sperm cells during storage. In previous studies, differences in TPB, PR, and FR were found among boars [8, 35, 36] when double insemination was performed using a range of 1.5 to 2.0 billion sperm cells in the semen doses. The pregnancy rate and farrowing rate were not affected by the class of boars in our study. Even though considering studies in which the FR was associated with plasma membrane integrity and total motility [8, 18], this association was not observed when related to PM [37]. The relation of sperm motility with PR or FR is more difficult to demonstrate when a minimal pattern of motility (60 %) is used [38]. In our study, the sperm motility at insemination was superior to the minimal pattern suggested for insemination in the practical conditions [27], even though for low-preservation boars. Considering this situation, we could reinforce

the effect of the class of boars as the main factor contributing to the difference observed in the TPB. It is probably mediated by differences in the sperm cell functionality between the classes of boars [8, 39].

As mentioned before, the effect of the class of boars on TPB was evident. However, it is also important to open this result and discuss considering the role of the boars in the different classes of boars. In the low-preservation group, it was possible to observe 66.7% of boars with less than 15 TPB, as opposed to observed in the high-preservation group, where 66.7% of the boars had ≥ 15 TPB. However, it is essential to point out that accurately, one boar in the class of low-preservation boars presented on average 9.5 ± 0.5 TPB (supplemental file). In this way, if we consider the total number of boars used, we could indicate 8.3% of less fertile boars based on TPB. In general, the presence of less fertile boars is reported between 7 to 15% [12, 40].

The use of long-term extender did not affect the *in vivo* reproductive performance when compared to short-term extender considering the use of single insemination with 1.5 billion sperm cells and stored until 24 h. The use of long-term extender has been used on a large scale [27], expecting an improvement in reproductive performance. However, previous studies that compared short- vs. long-term extender showed no improvement in reproductive performance when double insemination per estrus and semen doses with ≥ 2.5 billion sperm cells stored until 72h were used [20, 21, 41]. Thus, single insemination using long-term extender does not seem to affect reproductive performance even though considering the slight increase of PM at the moment of insemination for the class of low-preservation boars. In this case, the main effect was associated with the class of boars (low- or high-preservation). In our trial, the boar stud was located closer to the sow-farm (1 km approximately). In this way, we should consider that the use of

long-term extender could be associated with the guarantee of long shelf life for spermatozoa [20, 41] mainly for use of higher storage time and in situations of long distances for the transport of semen.

Semen doses of aging were related to a decrease in reproductive performance [28, 42]. The fertility rate was reduced when semen doses extended in BTS were used with more than 48 h of storage time in single insemination immediately after ovulation of gilts [28]. Regardless of the class of boars and extender, single inseminated sows with semen doses stored for 24 or 72 h did not affect PR and FR in this study. Impressive that the interaction of boar classes and storage time was observed for TPB. Semen doses from low-preservation boars used with 72 h had reduced TPB compared to high-preservation boars. Even though that a statistical difference was not ensured between semen doses from low-preservation boars at 24 compared to 72 h, we cannot disregard the numeric difference observed. It corroborates to the results obtained by Haugan et al. [22] in which a reduction on TPB was observed when homospermic semen doses diluted in BTS were used with more than 48h in single insemination. In long-term extender (Androrep), the effect on fertility compared to BTS was evident only when the semen doses were used with more than 96h of storage [22]. These results are essential for recommendations for the use of FTAI. In this way, the classification of boars based on PM during storage could be performed before the adoption of protocols for a single FTAI and only use high-preservation boars or to establish the use of semen doses up to 24 h of storage.

Even though considering the difficulty for selection of low-preservation boars based on the capacity for preserving progressive sperm motility until 120h of storage, from a practical standpoint, the results of this study may contribute with

the identification of less fertile boars. This methodology could be used for the identification of less fertile boars using *in vivo* evaluation only for the low-preservation boar classes, where more evident impacts on reproductive parameters were observed. This approach could reduce labor and time for the identification of less fertile boars in a field condition. We also should consider the necessity for additional studies to determine the minimal number of ejaculates necessary for a precise classification of low-preservation boars.

5. Conclusions

Boar classification based on progressive sperm motility at 120h of storage in BTS combined with the use of single insemination with the reduced number of sperm cells can be used to identify less fertile boars. The low-preservation boars had a reduced total piglet born. Single insemination of sows with semen doses with 72 h of storage from ejaculates of low-preservation boars has reduced the total number of piglets born.

Conflict of interest

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

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil), Agrocere PIC Brazil group for the financial support and to the Master Agroindustrial Company for providing the facilities to perform this study.

References

- [1] Broekhuijse M, Feitsma H, Gadella B. Field data analysis of boar semen quality. *Reprod Domest Anim.* 2011;46(Suppl 2):59-63. 10.1111/j.1439-0531.2011.01861.x.
- [2] Tsakmakidis I, Lymberopoulos A, Khalifa T. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J Vet Sci.* 2010;11(2):151-4. 10.4142/jvs.2010.11.2.151.
- [3] Dyck M, Foxcroft G, Patterson J, Willenburg K. Maximizing the impact of high value and high fertility boars. In: Smith J, editor. 12th London Swine Conference - A time for a change. 2012 Mar 18-29; London, Canada. London: London Swine Conference; 2012. p. 61-7.
- [4] Kummer A, Gaggini T, Bernardi M, McManus C, Gonçalves E, Wentz I, et al. Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analyzed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. *Reprod Domest Anim.* 2013;48(5):747-54. 10.1111/rda.12155.
- [5] Waterhouse K, De Angelis P, Haugan T, Paulenz H, Hofmo P, Farstad W. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology.* 2004;62(9):1638-51. 10.1016/j.theriogenology.2004.03.001.
- [6] Tardif S, Laforest J-P, Cormier N, Bailey J. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology.* 1999;52(3):447-59. 10.1016/S0093-691X(99)00142-9.
- [7] Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively Measured Boar Sperm Motility Parameters Correlate With the Outcomes of On-Farm Inseminations: Results of Two Fertility Trials. *J Androl.* 1997;18(3):312-23. 10.1002/j.1939-4640.1997.tb01925.x.
- [8] Ruiz-Sanchez AL, O'Donoghue R, Novak S, Dyck MK, Cosgrove JR, Dixon WT, et al. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology.* 2006;66(4):736-48. 10.1016/j.theriogenology.2005.12.012.
- [9] Flowers W, Deller F, Stewart K. Use of heterospermic inseminations and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits and seminal plasma proteins in boar fertility. *Anim Reprod Sci.* 2016;174:123-31. 10.1016/j.anireprosci.2016.09.016.
- [10] Ferreira C, Sávio D, Guarise A, Flach M, Gastal G, Gonçalves A, et al. Contribution of boars to reproductive performance and paternity after homospermic and heterospermic artificial insemination. *Reprod Fertil Dev.* 2015;27(7):1012-9. 10.1071/RD13418.
- [11] Foxcroft GR, Patterson J, Cameron A, Dyck MK. Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. In: D'Allaire S, Friendship R, editors. Proceedings of the 21st IPVS Congress. 2010 July 18-21; Vancouver, Canada. Vancouver: Hein Jonker Media Management; 2010. p. 18-21.
- [12] Roca J, Broekhuijse M, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Martinez E, Bolarin A. Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized? *Reprod Domest Anim.* 2015;50(S2):48-55. 10.1111/rda.12530.
- [13] Reis GR, Bernardi ML, Schwarz P, Bortolozzo FP, Wentz I. Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. *Acta Sci Vet.* 2002;30(3):159-66. 10.22456/1679-9216.17225.

- [14] Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle I. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand.* 2002;43(1):49. 10.1186/1751-0147-43-49.
- [15] Paulenz H, Kommisrud E, Hofmo P. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod Domest Anim.* 2000;35(2):83-7. 10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x.
- [16] Foxcroft G, Dyck M, Ruiz-Sanchez A, Novak S, Dixon W. Identifying useable semen. *Theriogenology.* 2008;70(8):1324-36. 10.1016/j.theriogenology.2008.07.015.
- [17] Waberski D, Henning H, Petrunkina A. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim.* 2011;46(s2):45-8. 10.1111/j.1439-0531.2011.01836.x.
- [18] Juonala T, Lintukangas S, Nurtila T, Andersson M. Relationship Between Semen Quality and Fertility in 106 AI-Boars. *Reprod Domest Anim.* 1998;33(3-4):155-8. 10.1111/j.1439-0531.1998.tb01334.x.
- [19] Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology.* 2004;62(5):874-86. 10.1016/j.theriogenology.2003.12.006.
- [20] Pinart E, Yeste M, Prieto-Martínez N, Reixach J, Bonet S. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter? *Theriogenology.* 2015;83(9):1428-37. 10.1016/j.theriogenology.2015.01.007.
- [21] Haugan T, Gaustad A, Reksen O, Gröhn Y, Hofmo P. Fertility Results of Artificial Inseminations Performed with Liquid Boar Semen Stored in X-Cell™ vs BTS Extender. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(1):94-9. 10.1111/j.1439-0531.2006.00738.x.
- [22] Haugan T, Reksen O, Gröhn YT, Gaustad AH, Hofmo PO. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology.* 2005;64(4):891-901. 10.1016/j.theriogenology.2004.12.013.
- [23] Teixeira S, Chaveiro A, Moreira da Silva F. The effects of three extenders on refrigerated boar semen. *S Afr J Anim Sci.* 2015;45(1):82-8. 10.4314/sajas.v45i1.10.
- [24] Yeste M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Anim Reprod.* 2017;14(1):69-81. 10.21451/1984-3143-AR895.
- [25] Knox RV. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology.* 2016;85(1):83-93. 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.
- [26] Pezo F, Romero F, Zambrano F, Sánchez R. Preservation of boar semen: An update. *Reprod Domest Anim.* 2018. 10.1111/rda.13389
- [27] Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L. Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. *Theriogenology.* 2019;137:2-7. 10.1016/j.theriogenology.2019.05.030.
- [28] Waberski D, Weitze K, Lietmann C, Zur Lage W, Bortolozzo F, Willmen T, et al. The initial fertilizing capacity of longerm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. *Theriogenology.* 1994;41(7):1367-77. 10.1016/0093-691X(94)90188-O.
- [29] Hancock J, Hovell G. The collection of boar semen. *Vet Rec.* 1959;71:664-5.

- [30] Paschoal AFL, Santos JT, Mellagi APG, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP. Use of testicular tone and echogenicity in identifying boars with low sperm quality. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2019;71:1277-85. 10.1590/1678-4162-10860.
- [31] Knox R, Willenburg K, Rodriguez-Zas S, Greger D, Hafs H, Swanson M. Synchronization of ovulation and fertility in weaned sows treated with intravaginal triptorelin is influenced by timing of administration and follicle size. *Theriogenology.* 2011;75(2):308-19. 10.1016/j.theriogenology.2010.09.001.
- [32] Henning H, Petrunkina AM, Harrison RA, Waberski D. Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function. *Reprod Fertil Dev.* 2014;26(5):623-32. 10.1071/RD13113.
- [33] Gaczarzewicz D, Udala J, Piasecka M, Blaszczyk B, Stankiewicz T. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turk J Biol.* 2015;39(4):582-94. 10.3906/biy-1412-76.
- [34] Johnson L, Weitze K, Fiser P, Maxwell W. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62(1):143-72. 10.1016/S0378-4320(00)00157-3.
- [35] Williams A, Johnson A, Miller D, Holden N, Patterson J, Dyck M, et al. Commercial application of reducing semen concentration per dose and single sire evaluation. Allen D Lemay Swine Conference. Twin Cities, US. Twin Cities: University of Minnesota; 2011. p. 131-4.
- [36] Minton A, Johnson A, Werner T, Triemert E, Holden N, Foxcroft G, et al. Evaluation and Economic Impact of Boar Fertility. Banff Pork Seminar - Advances in Pork Production. 2013 Jan 15-17; Edmonton, Canada. Edmonton: University of Alberta; 2013. p. 197-202.
- [37] Popwell JM, Flowers WL. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Anim Reprod Sci.* 2004;81(1-2):97-113. 10.1016/j.anireprosci.2003.08.007.
- [38] Flowers W. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil.* 1997;52:67-78.
- [39] Flowers WL. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology.* 2008;70(8):1297-303. 10.1016/j.theriogenology.2008.06.016.
- [40] Patterson J, Linck L, Williams A, Johnson A, Miller D, Holden N, et al. Increasing the genetic impact of elite boars. Banff Pork Seminar - Advances in Pork Production. 2011 Jan 18-21; Edmonton, Canada. Edmonton: University of Alberta; 2011. (Abstr. #4).
- [41] Bresciani C, Bianchera A, Bettini R, Buschini A, Marchi L, Cabassi CS, et al. Long-term liquid storage and reproductive evaluation of an innovative boar semen extender (Formula12®) containing a non-reducing disaccharide and an enzymatic agent. *Anim Reprod Sci.* 2017;180:10-6. 10.1016/j.anireprosci.2017.02.007.
- [42] Anil SS, Larriestra A, Deen J, Morrison RB, Minion L. A retrospective study on the preserving capacity of a commercial boar semen extender. *Theriogenology.* 2004;62(3-4):425-36. 10.1016/j.theriogenology.2003.10.019.

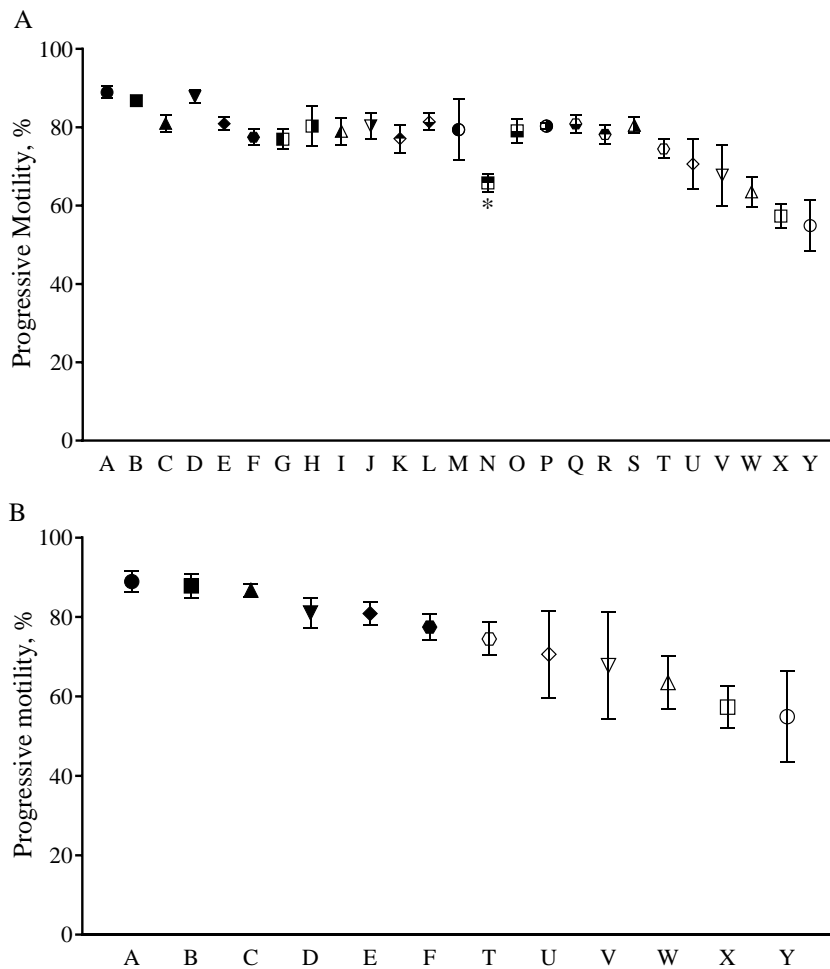


Figure 1. Description of the average (\pm SEM) of progressive sperm motility during the period of classification of the boars included in the study (A) and considering those boars selected according to the ranking of progressive motility at 120 h of storage (B) using the extender Beltsville Thawing Solution.

Three semen collection once a week were performed to define the classes of low- and high-preservation boars. Black icons represent high-preservation boars and the white icons the low-preservation boars. *Boar not included in the low-preservation class due to high progressive sperm motility at 72 h (79 %),

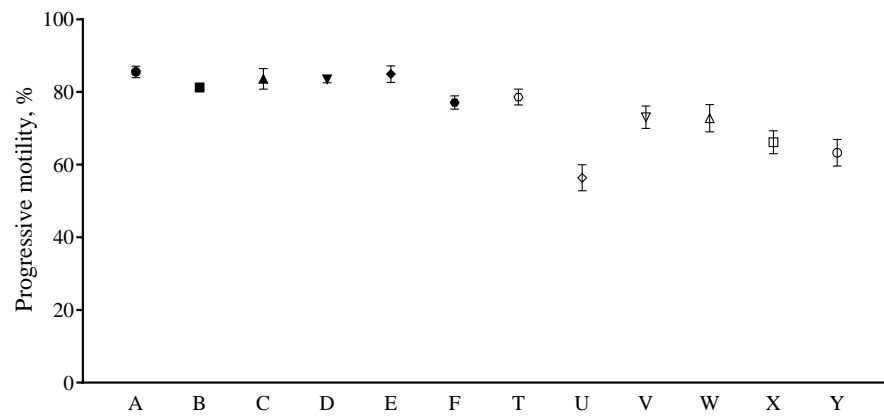


Figure 2. Description of the average of progressive sperm motility at 120 h of storage in the extender Beltsville Thawing Solution during six consecutive semen collection of twelve boars classified as low- or high-preservation, during the period of insemination of the sows.

Table 1. Sperm motility and reproductive performance of classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses at 120 h of storage and considering to extend the ejaculates in short- or long-term extenders for a single fixed-time insemination of weaned sows.

Variables	Low-Preservation Boar		High-Preservation Boar		SEM	Effect P < 0.05
	Short-Term	Long-Term	Short-Term	Long-Term		
Sows inseminated, n	130	127	133	129	-	-
Total Motility [‡] , %	86.8 ^c	89.4 ^b	94.2 ^a	94.6 ^a	1.0	C*E
Progressive Motility [‡] , %	73.2 ^d	77.9 ^c	86.8 ^b	87.8 ^a	2.0	C*E
Pregnancy Rate, %	90.7	95.2	91.0	89.1	2.7	-
(n/n)	(118/130)	(121/127)	(121/133)	(115/129)		
Farrowing Rate, %	86.1	89.7	88.0	88.4	3.0	-
(n/n)	(114/130)	(112/127)	(117/133)	(117/129)		
Total number of piglets born	14.2 ^b	14.0 ^b	15.0 ^a	15.6 ^a	0.3	C

Values expressed as LSMeans ± Standard Error of Mean; abcd: with different letters within each row were different ($P \leq 0,05$); Class of boar (C) was defined according to progressive motility at 120h of storage using Beltsville Thawing Solution extender (six boars in each class); Type of extender (E) has considered the use of short- or long-term extender (BTS or Androstar Plus, respectively); A total of 519 sows were submitted to a factorial design considering the C×E, [‡]Sperm motilities at the moment of insemination considering the analysis of a sample of the batch of semen doses,

Table 2. Reproductive performance of the classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses at 120 h of storage and considering the use of different semen extenders in a protocol of a single fixed-time insemination for weaned sows.

Class of boars	Low-preservation	High-preservation	P-value
Sows inseminated, n	257	262	-
Total Motility [‡] , %	88.2 ± 1.0	94.4 ± 0.5	-
Progressive Motility [‡] , %	75.6 ± 1.9	87.3 ± 1.1	-
Pregnancy Rate, %	93.3 ± 1.5	90.1 ± 1.2	0.187
(n/n)	(240/257)	(236/262)	
Farrowing Rate, %	88.8 ± 1.6	88.2 ± 1.6	0.973
(n/n)	(226/257)	(231/262)	
Total Piglets Born, n	14.1 ± 0.2	15.0 ± 0.2	< 0.010
Type of extender	Short-term	Long-term	
Sows inseminated, n	263	256	-
Total Motility [‡] , %	91.2 ± 0.7	92.4 ± 0.8	-
Progressive Motility [‡] , %	80.9 ± 1.4	83.4 ± 1.5	-
Pregnancy Rate, %	90.8 ± 1.7	92.8 ± 1.6	0.438
(n/n)	(239/263)	(/256)	
Farrowing Rate, %	87.1 ± 1.9	89.1 ± 1.9	0.483
(n/n)	(229/263)	(228/256)	
Total Piglets Born, n	14.5 ± 0.2	14.6 ± 0.2	0.700

Values expressed as LSMeans ± Standard Error of Mean;

[‡]The sperm motilities were evaluated using 36 samples/group (6 ejaculates/boar);

Table 3. Sperm motility and reproductive performance of the classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses and considering the use of short- or long-term extenders to produced the semen doses for use in single fixed-time insemination at 24 h or 72 h of storage.

Variables	Low-preservation boars				High-preservation boars				SEM	Effect P < 0,05
	Short-term		Long-term		Short-term		Long-term			
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h		
Sows inseminated, n	48	52	46	51	49	51	50	50	-	-
Total sperm motility [‡] , %	86.9	85.5	89.4	85.8	94.2	91.6	94.6	91.3	1.3	C*E; C*T; E*T
Progressive sperm motility [‡] , %	73.3	72.3	77.8	73.3	86.9	84.3	87.0	82.4	1.9	C*E; C*T; E*T
Pregnancy Rate, % (n/n)	89.5 (43/48)	98.0 (51/52)	95.6 (45/46)	94.1 (48/51)	91.8 (45/49)	96.1 (49/51)	88.0 (44/50)	86.0 (43/50)	4.9	-
Farrowing Rate, % (n/n)	89.5 (43/48)	96.1 (50/52)	91.3 (42/46)	92.1 (47/51)	87.7 (43/49)	94.1 (48/51)	86.0 (43/50)	84.0 (42/50)	5.1	-
Total number of piglets born	15.3	13.3	14.4	14.0	15.5	15.2	14.9	15.8	0.6	C*T

Values expressed as LSMeans \pm Standard Error of Mean; Class of boar (C) was defined according to progressive sperm motility at 120h of storage using Beltsville Thawing Solution extender (six boars in each class); Type of extender (E) has considered the use of short- or long-term extender (BTS or Androstar Plus, respectively); Storage time (T) of semen doses at the moment of insemination, A total of 397 sows were submitted to a factorial design considering the C \times E \times T, [‡]Sperm motilities at the moment of insemination considering the analysis of a sample of the batch of semen doses.

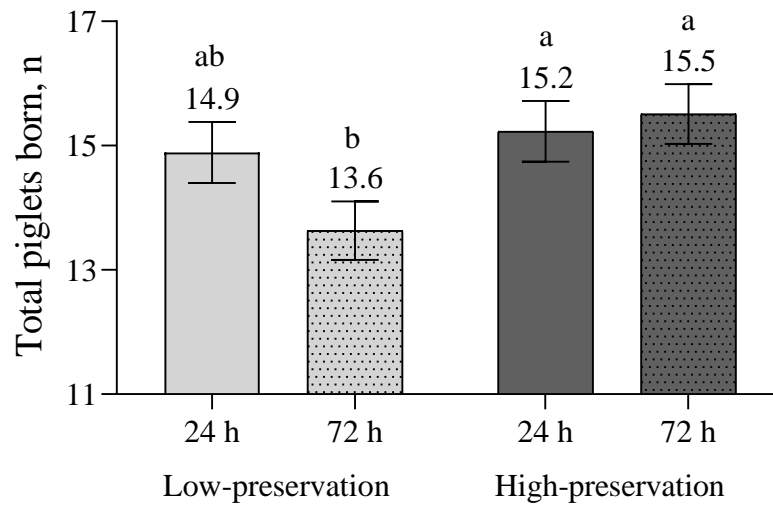
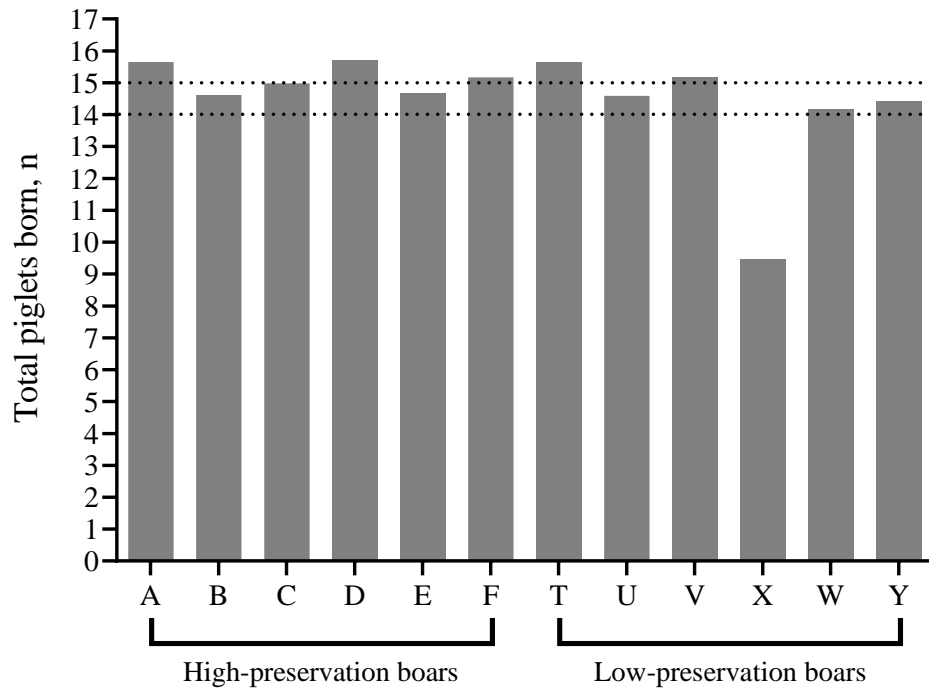


Figure 3. Total piglets born of the classes of boars defined as low- or high-preservation of the semen doses at 120 h of storage and considering the use of semen doses with 24 h or 72 h of storage for a single fixed-time insemination.

A total of 397 sows were considered.

ab with different letters were different ($P \leq 0.05$)



Supplement material. Total piglets born per boar into each class of boars defined as low- or high-preservation.

The superior line showed that half of the high-preservation boars had more than 15 piglets born, while the low-preservation boars had most of boars with less than 15 piglets born.

CAPÍTULO IV – TERCEIRO MANUSCRITO

*PROTEOMIC APPROACHES IN SEMINAL PLASMA ASSOCIATED WITH
CAPACITY FOR BOAR SEMEN PRESERVATION AND FERTILITY*

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO

1 **Proteomic approaches in seminal plasma associated with capacity for boar**
2 **semen preservation and fertility**

3
4 M.S. Lucca², I. C. Bustamante-Filho³, R.D.F. Gianluppi¹, J.A.M. Evaristo⁴, F. C. S.
5 Nogueira³, R.R. Ulguim¹, A.P.G. Mellagi¹, I. Wentz¹, F.P. Bortolozzo^{1*}

6
7 **Abstract**

8 To provide new insights into proteins that may serve as markers for boar
9 fertility, we carried out a comparative proteome analysis of seminal plasma in two
10 different preservation classes of boars to semen storage. This research aimed at
11 exploring seminal plasma (SP) proteome differences expressed between low- and
12 high-preservation boars as an indicator of fertility. Twelve boars were classified in
13 low- (LP) and high-preservation (HP) capacity for maintaining the progressive
14 motility (PM) at 120 h of storage. A total of 519 weaned sows were single
15 inseminated 24 h after ovulation induction with triptorelin (OvuGel[®]). The PM at
16 insemination was affected by the interaction of the class of boars and storage time
17 ($P < 0.01$). Farrowing rate was not affected by the of the class of boars. However,
18 LP boars presented lower TPB (14.1 ± 0.2) compared to HP boars (15.0 ± 0.2 ; $P <$
19 0.01). To identify the proteins expressed in the SP between LP and HP ejaculates,
20 six ejaculates of each boar ($n = 36$ ejaculates per group) were analyzed by LC-
21 MS/MS. A total of 257 proteins were identified. In this sense, both categories of
22 boars had 184 similar SP proteins and the LP and HP boars had 41 and 32 SP

² Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Setor de Suínos. Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +555133088044; E-mail address: fpb@ufrgs.br (F.P. Bortolozzo).

³ Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari—Univates, Lajeado, Brazil.

⁴ Laboratory of Proteomics, LADETEC, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

23 proteins that were exclusive for each group. Ten proteins were differently expressed
24 in both groups ($FC \geq 1.5$). Five proteins (SPMI, ZPBP1, FN1, HPX, and C3) were
25 associated with HP and the other five proteins (B2M, COL1A1, NKX3-2, MPZL1
26 and KRT1) were associated with LP boars. This study extended our knowledge of
27 the SP proteome and revealed some SP proteins as potential biomarkers of for boar
28 semen preservation and indirectly with fertility.

29

30 **Keywords.** Swine, resistance to cooling, progressive motility, total piglets
31 born.

32

33 **1. Introduction**

34 Artificial insemination (AI) is used worldwide by the swine industry
35 (WABERSKI *et al.*, 2019). Currently, boar studs produce a large number of semen
36 doses following rigorous semen quality controls (PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2018).
37 However, it is known that there is evidence that a subpopulation of boars
38 demonstrates suboptimal fertility despite producing semen doses with acceptable
39 spermatoc parameters for AI (DYCK *et al.*, 2011). Sows inseminated with semen
40 from subfertile boars may have a reduction in pregnancy and farrowing rates as well
41 as decreased litter size (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006; FLOWERS *et al.*, 2016). There
42 are estimates that 5 to 15 % of boars in commercial production systems are
43 subfertile (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2006; MAY *et al.*, 2015). On way to detect these
44 boars could be through measuring motility of semen doses during storage (RUIZ-
45 SANCHEZ *et al.*, 2006), associated with possible biological markers in the seminal
46 plasma. Thereby facilitating the identification of less fertile boars.

47 The ejaculate consists of a large volume of sperm cells suspended in a fluid
48 called seminal plasma (SP). SP consists of a mixture of secretions from the testis,
49 epididymis, and, mainly, the accessory sexual glands (FOXCROFT *et al.*, 2008).
50 Thus, the SP plays many functions such as the maintenance of viability,
51 metabolism, motility, regulation of capacitation, besides, it could also influence
52 sperm functionality *in vivo* and its ability to interact with the female reproductive
53 tract, conditioning immune modulation, fertilization and subsequent embryo
54 development (RECUERO *et al.*, 2019). The main components of the SP are the
55 proteins, which may influence not only the spermatozoa but also the female genital
56 tract (CABALLERO *et al.*, 2008; DE LAZARI *et al.*, 2018). The proteins in the SP are
57 responsible for an important role in sperm reservoir formation, sperm capacitation,
58 and sperm-oocyte interactions (NOVAK *et al.*, 2010). Therefore, the characterization
59 of the seminal plasma proteome could be used as a valuable tool to identify proteins
60 for sperm maturation, viability, and fertilization (BUSTAMANTE-FILHO *et al.*, 2014)
61 and thus, providing a more detailed evaluation of the boar fertility.

62 Studies with proteomics have already identified more than 500 proteins in
63 boar seminal plasma (DYCK *et al.*, 2011; GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014; PÉREZ-
64 PATIÑO *et al.*, 2016). In swine reproduction, this technique has been used mainly
65 for the detection of the proteomic markers of fertility and semen quality
66 (BUSTAMANTE-FILHO *et al.*, 2019). Some studies (NOVAK *et al.*, 2010; VILAGRAN
67 *et al.*, 2015; DE LAZARI *et al.*, 2018; PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2018) already showed
68 that some specific proteins have an association with seminal or fertility
69 characteristics. However, the use of a high number of spermatozoa per AI dose
70 (typically $\geq 1.5 \times 10^9$ cells/dose) and heterospermic inseminations mask the presence
71 of poor fertility boars (FOXCROFT *et al.*, 2008). Therefore, the methodology most
72 precise for mensuration of the relative fertility of boar is through farrowing rate and

73 the total number of piglets born (FOXCROFT *et al.*, 2010). Besides, incorporating
74 proteomic markers into boar evaluation may provide additional information to be
75 utilized for the identification of boar fertility (MAY *et al.*, 2015). So, the present
76 study aimed at exploring seminal plasma proteome differences expressed between
77 low- and high-preservation as an indicator of boar fertility.

78

79 **2. Material e Methods**

80 The experiment was carried out on a commercial swine farm and its boar
81 stud located in Santa Catarina state, Brazil. The study was conducted with approval
82 from the Federal University of Rio Grande do Sul's Ethics Committee on the Use
83 of Animals (Protocol number 34329).

84

85 *2.1. Animal and facilities*

86 Thirty-two healthy boars (AG 337 - Agroceres PIC®, Patos de Minas, MG,
87 Brazil) with $19,6 \pm 9.1$ months of age were used. They were individually housed in
88 stalls (2.4×0.7 m) in a temperature-controlled barn ($18 - 23$ °C). The boars were
89 fed twice a day with a corn-soybean based diet (12.5% CP, 0.68% SID Lysine and
90 3.25 Mcal ME/kg) according to body condition score (BCS – 1 to 5). Boars with \leq
91 3 and > 3 BCS were fed 2.4 and 2.2 kg/d, respectively. Water was provided ad
92 libitum.

93 A total of 519 ($n = 257$ for LP; $n = 262$ for HP) crossbred weaned sows
94 (Camborough - Agroceres PIC®, Patos de Minas, MG, Brazil) were selected. After
95 weaning, the sows were housed in individual crates (2.2×0.6 m) for estrus
96 detection, breeding, and gestation. They were fed in automatic feeders with a corn-
97 soybean diet (14% CP, 0.62% SID Lysine and 3.30 Mcal ME/kg) and ad libitum

98 access to water. During the weaning-to-estrus interval, sows were fed with 4.0 kg/d
99 until the first insemination and then with 2.0 kg/d from day 0 to 35 of gestation.
100 After this period (36 d until the farrowing), all sows received 1.8 kg/d of the same
101 diet. The temperature inside the barns was controlled based on curtain management.

102

103 *2.2. Classification of boars according to the capacity of preservation*

104 Ejaculates of thirty-two boars were extended in BTS and evaluated
105 according to the progressive sperm motility (PM) at 120 h of storage at $17 \pm 1^\circ\text{C}$.
106 Each boar had three ejaculates evaluated for three consecutive weeks (collected
107 once a week), including analysis of the sperm morphology of all ejaculates as a
108 criterion for exclusion. Twelve boars were selected according to the ranking of the
109 average of PM at 120 h. Six boars in both extremities (low and high) were classified
110 as following: low-preservation at 120 h (LP; median – 64.5%; range - 54.9% to
111 70.6% of PM) and high-preservation at 120 h (HP; median – 83.9%; range – 77.5%
112 to 88.9% of PM). All boars selected in the LP class had the PM at 72h lower than
113 73% and in the HP class greater than 80%. In this way, the final selection has
114 considered those boars ranked by PM at 120 h. However, it also considered the PM
115 at 72h. Boars with low semen production ($n=4$) and sperm abnormalities higher
116 than 20% ($n=3$) were excluded from the experiment.

117

118 *2.3. Semen collection, processing and analyzes*

119 After classification of boars, six ejaculates per boar ($n = 72$) were collected
120 using the glove-hand method within a pre-warmed (38°C) collection cup equipped
121 with a filter for removal of the gel fraction (blue bag[®] - Minitüb, Tiefenbach,
122 Germany), during the six weeks (once a week). Before weighing, one sample of 10
123 mL of entire raw ejaculate was collected for further proteomic analyses. Raw semen

124 was weighed (assuming 1 g of semen equals 1 ml) and evaluated for motility score
125 of ejaculate, and concentration was obtained using a computer-assisted semen
126 analyzer (CASA system; Sperm Vision[®] 3.7; Minitüb, Tiefenbach, Germany).
127 After that, the ejaculates were diluted into semen doses (50mL) with 1.5×10^9
128 spermatozoa per dose. The semen doses were maintained at a temperature of $17^\circ \pm$
129 1°C for up to 10 days.

130 The sperm motility was evaluated at days 1, 3, 5, and 10 after collection,
131 using a 3 μl drop from a 1 ml stored semen sample pre-warmed for 10 min into a
132 thermo block on the top of a warming plate at 38°C . Immediately after, eight fields
133 along the centerline per slide (Leja, Nieuw Venne, Netherlands, with a depth of
134 $20 \mu\text{m}$) were analyzed at $200\times$ magnification. The analyses were accepted when the
135 coefficient of variation between field concentrations (total number of counted cells
136 per field) was lower than 15 %.

137

138 *2.4. Assessment of reproductive performance*

139 The crossbred weaned sows were selected according to parity (3.2 ± 1.5 ; 1
140 to 7), BCS (2.8 ± 0.3 ; 2.5 to 3.5), lactation length (20.2 ± 1.1 ; 18 to 23 days), and
141 previous total piglets born (15.6 ± 2.6 ; ≥ 9). The sows were inseminated using a
142 protocol of fixed-time artificial insemination as follow: the detection of estrus
143 started on the weaning day and was performed once a day (8 am) using a fence-line
144 boar contact and the back-pressure test; the occurrence of estrous was defined by
145 the standing reflex in front of a boar (back-pressure test); only females that did not
146 show estrous until 96 h were treated with 200 μg of triptorelin acetate (OvuGel[®],
147 JBS United Animal Health LLC, Sheridan, USA) at 96 h post-weaning as described
148 by Knox *et al.* (2011), and only sows in estrous received a single semen dose

149 between 22 - 24 h after the administration of OvuGel[®]. The post-cervical
150 insemination was performed in all sows in the presence of boar. The farrowing rate
151 (FR) and the total number of piglets born (TPB), were recorded.

152

153 *2.5. Fertility data analysis*

154 All the statistical analyses for fertility data were carried out using the SAS[®]
155 software (SAS, version 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). All descriptive data
156 are expressed as mean \pm standard error (SE). The different classes of boars were
157 defined according to the ranking of average for PM, using descriptive statistical
158 analysis.

159 Total and progressive motility were analyzed by GLIMMIX procedure in a
160 binomial distribution and analyzed by repeated measurements, except by day 10 of
161 storage, which was assessed individually. Farrowing rate (FR) was analyzed by
162 logistic regression (GLIMMIX procedure) using a binary distribution. The total
163 piglets born (TPB) was analyzed, assuming a normal distribution by GLIMMIX
164 procedure and means compared by Tukey-Kramer adjustment. The differences
165 were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P \leq 0.05$).

166

167 *2.6. Proteomic analysis*

168 The proteome analyses were carried out in the laboratory of Proteomics, of
169 the Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

170

171 *2.6.1. Sample Preparation*

172 Immediately after ejaculate collection, one sample of raw semen from each
173 ejaculate was centrifuged once at 800g for 10 min. A protease inhibitor (Protease
174 Inhibitor Cocktail, Sigma, St. Louis, USA) at 1% was added to the supernatant (2
175 mL seminal plasma). The samples were stored in liquid nitrogen (-196°C) for

176 transport. In the laboratory, a second centrifugation at 12,000 g for 60 min at 4°C
177 was performed to remove the spermatozoa and cell debris. After that, the samples
178 were stored at -80 °C (Ultra low-temperature freezer; PHC Corporation, US). Pools
179 of samples were prepared for the analysis. One pool from the six samples of seminal
180 plasm from each boar (6 ejaculates) were firstly produced. Thereafter, within each
181 preservation class of boars (6 boars/class), samples using pools of two boars were
182 produced totalizing three pools analyzed per preservation class of boars.

183

184 *2.6.2. Protein digestion*

185 Proteins (100 µg of each treatment) were incubated with dithiothreitol
186 (DTT) at final concentration of 10 mM for 30 min at 37 °C; afterwards,
187 iodoacetamide (final concentration of 40 mM) was added and incubated for 30 min
188 in the dark at room temperature and then incubated with sequence grade modified
189 Trypsin (Promega) at 1/50 trypsin/protein ratio for 16 h at 37 °C. Resulting peptides
190 were loaded onto a homemade Porous R2 column, washed with TFA 0.1 %, and
191 eluted with Acetonitrile 50% and 70% sequentially. Fractions were collected and
192 dried in a speed vacuum concentrator.

193

194 *2.6.3. Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry Analysis*

195 Each fraction or pool of fractions was analyzed in three technical replicates
196 in an Easy-nLC 1000 nano-LC system (Thermo Scientific) coupled to a quadrupole-
197 Orbitrap (Q-Exactive Plus) mass spectrometer (Thermo Scientific). Samples were
198 dissolved in 100 µl of 0.1% formic acid (FA), loaded onto a trap column
199 (ReprosilPur C18, 2 cm × 150 µm i.d. × 5µm) with a flow rate of 5 µl/min and
200 separated on the analytical column (ReprosilPur C18, 25 cm × 75 µm i.d. × 3 µm)

201 with a constant flow rate of 300 nL/min and linear gradient of 5-40% of B (95%
202 ACN, 0.1% FA) in 180 min. For electrospray, 3 kV and 250 °C were applied at the
203 inlet of mass spectrometer. The Q-Exactive mass spectrometer was operated in
204 data-dependent analysis (DDA) mode with dynamic exclusion of 45 ms and full-
205 scan MS spectra with resolution of 70,000; followed by fragmentation of 15 most
206 intense ions with high energy collisional dissociation (HCD), normalized collision
207 energy (NCE) of 30 and resolution of 17,500 in MS/MS scans. Species with a
208 charge of +1 or greater than +4 were excluded from MS/MS analysis.

209

210 *2.6.4. Data analysis for proteomics*

211 Raw data were processed using Proteome Discoverer 2.1 Software (Thermo
212 Scientific). Peptide identification was performed with Sequest HT algorithm
213 against *Sus scrofa* database provided by Uniprot. The searches were run with
214 peptide mass tolerance of 10 ppm, MS/MS tolerance of 0.05 Da, tryptic cleavage
215 specificity, two maximum missed cleavage sites, fixed modification of
216 carbamidomethyl (Cys) and variable modification of acetylation of protein N-
217 Terminus and oxidation of Methionine. False discovery rates (FDR) were obtained
218 using Percolator node selecting identifications with a q-value equal or to less than
219 0.01.

220

221 *2.6.5. Gene Ontology and Bioinformatics Analysis*

222 The bioinformatics identified and validated SP proteins were performed in
223 OmicsBox software version 1.2 (BioBam Bioinformatics, Spain). It was used to
224 categorize the proteins detected by Gene Ontology (GO) annotation according to
225 cellular component, molecular function, the biological processes, with a special
226 mention to the reproductive process.

227

228 *2.6.6. Protein-protein interaction analysis*

229 Protein-protein interactions were analyzed using a Web-based bioinformatic
230 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) software,
231 version 11. STRING (<https://string-db.org>) is a database of interactions for known
232 or predicted proteins, including physical and functional associations from genomic
233 contexts, high-throughput experiments, coexpression, and previous knowledge.
234 The identified proteins in seminal plasma that were differently expressed in HP and
235 LP boars semen were entered into STRING for analysis of potential protein-protein
236 interactions. The interaction search was restricted to *Sus scrofa*; each interaction
237 has a combined score (edge score), which represents the reliability of the interaction
238 between proteins.

239

240 **3. Results**

241 3.1. Fertility records

242 In the phase of selection of boars, the PM at day 5 of storage diluted in BTS
243 was different between the class of boars (65.3 ± 2.2 % vs 84.5 ± 1.3 %; $P < 0.01$),
244 and in the post-selection this difference was maintained (69.3 ± 1.7 % vs 83.2 ± 1.1
245 %; $P < 0.01$).

246 For the total motility (Figure 1A), an interaction was observed between the
247 class of boar and storage time ($P < 0,05$), the HP boars were superior than LP boars
248 at 1 day (94.1 ± 0.3 vs 88.6 ± 0.6 %), 3 days (92.8 ± 0.4 vs 87.9 ± 0.6 %), and 5
249 days (92.2 ± 0.4 vs 86.3 ± 0.7 %) of storage. However, the progressive motility
250 (Figure 1B) was not affected by the interaction between the class of boar and storage
251 time ($P > 0.23$). For the PM, only was observed difference for class of boar, the HP
252 boars had higher PM than LP in all moments analyzed ($P < 0.01$). On day 10 of

253 storage, the TM and PM showed effect for the class of boar. The TM for HP was
254 higher than LP (88.6 ± 1.3 vs 75.6 ± 2.3 %; $P < 0.01$). For PM the HP boars were
255 superior to LP (77.3 ± 1.3 vs 56.3 ± 2.8 %; $P < 0.01$).

256 A total of 519 sows were inseminated during the period of the experiment
257 (Figure 2). The sows selected had on average (Mean \pm SD) 2.8 ± 0.3 body condition
258 score, 3.2 ± 1.5 parity, 20.2 ± 1.0 lactation length, and 15.6 ± 2.6 previous total
259 piglets born. For the farrowing rate (Figure 2A), there was no difference ($P > 0.05$)
260 between the LP boars (88.8%) and HP boars (88.2%). However, for the total
261 number of piglets born (Figure 2B), the HP boars had 15.0 piglets while the LP
262 boars had 14.1 piglets ($P < 0.01$). In addition, the calculated piglet index (Figure
263 2C) demonstrated 71 piglets more in HP boars when compared to LP boars.

264

265 3.2. *Differential Boar Seminal Plasma Proteomics*

266 The liquid chromatography and tandem mass spectrometry analysis (LC-
267 MS/MS) successfully identified a total of 257 SP proteins, being 225 and 215 SP
268 proteins for LP and HP boars, respectively (Figure 3). In this sense, both categories
269 of boars had 184 (Table S1) similar SP proteins and the HP and LP boars had 32
270 (Table S2) and 41 (Table S3) SP proteins that were exclusive for each group,
271 respectively.

272 The frequency distribution of the proteins associated with the cellular
273 component, molecular function, biological process and reproductive process,
274 identified in seminal plasma for each class of boars, are shown in Figure 4. For
275 cellular components (Figure 4A), a total of 300 hits was identified for the HP boars
276 and most of them belonged to the cellular anatomical entity (171; 57%), followed
277 by intracellular (98; 33%) and protein-containing complex (31; 10%). In the LP
278 boars, a total of 298 hits for the same cellular components was found, is 58% (173)

279 related to the cellular anatomical entity, 32% (94) for intracellular and 10% (31) for
280 protein-containing complex. For the molecular function (Figure 4B) a total of 445
281 hits associated to binding (109; 49%), catalytic activity (93; 42%) and molecular
282 function regulator (22; 10%) were identified for HP boars. The LP boars showed a
283 similar distribution for the molecular functions: binding (107, 48%), catalytic
284 activity (91, 41%) and molecular function regulator (23, 10%).

285 For HP boars a total of 1081 hits were enclosed into the biological process
286 (Figure 4C), and the main components were associated to the cellular process (132;
287 12%), metabolic process (114; 11%) and biological regulation (100; 9%). A total
288 of 1097 hits were identified for LP boars into the biological process. Particularly
289 implicated in the reproductive process, into the biological regulation, a total of 41
290 hits (4%) for HP and 37 hits (3%) for LP were identified.

291 In the components specifically associated with the reproductive process in
292 level 2, a slight difference between the two classes of boars was observed (Figure
293 4D). The same percentage of hits for fertilization (27; 21%), cellular process
294 involved in reproduction multicellular organism (12; 9%), regulation of
295 reproductive process (5; 4%), sperm motility (4; 3%), acrosome reaction (4; 3%)
296 were observed for LP and HP. However, the HP boars showed a higher percentage
297 of hits for the multicellular organismal reproductive process (37; 29% vs. 35; 28%)
298 and the developmental process involved in reproduction (16; 12% vs. 14; 11%) than
299 LP boars. Opposed to that, the LP boars showed a higher percentage of sperm-egg
300 recognition (8; 6% vs. 7; 5%) than HP boars and only LP boars had 2% (3 hits) of
301 the positive regulation of the reproductive process.

302

303 *3.3. Differences in SP Proteome Profile among the class of Boars*

304 The differentially (fold change - $FC \geq 1.5$) expressed proteins from HP and
305 LP boars are shown in Table 1. From the total of 184 protein present in both class
306 of boars, only ten proteins were differentially expressed in the SP of the boars. The
307 protein over-expressed for HP boars was the zona pellucida-binding protein 1 (FC
308 = 1.7), while the protein over-expressed for LP boars was the beta-2-microglobulin
309 ($FC = 2.44$).

310

311 3.4. Protein-protein interaction analysis

312 The protein-protein interactions network (Figure 5A) demonstrated medium
313 edge (score = 0.4) confidence among hemopexin, complement component 3, and
314 fibronectin; however, the highest (score = 0.9) was observed between complement
315 component 3 and fibronectin. Another, high interaction (score = 0.8) was
316 determined between zona pellucida-binding protein 1 and seminal plasma sperm
317 motility inhibitor. Such high interaction indicates that the proteins are functionally
318 linked.

319

320 4. Discussion

321 Several studies in boars have shown that SP proteins could be associated
322 with sperm parameters (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014; DE LAZARI *et al.*, 2018),
323 the capacity of maintaining sperm motility (DE LAZARI *et al.*, 2019) and with
324 reproductive performance (PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2018). In order to provide new
325 insights into proteins that may serve as markers for boar fertility we carried out a
326 comparative proteome analysis of seminal plasma in two different preservation
327 classes of boars to semen storage. In comparison to other studies (GONZALEZ-
328 CADAVID *et al.*, 2014; PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2016) with a more exploratory goal, a
329 lower number of SP proteins were identified (257) in this study. This was possibly

330 associated with the approach of the study for finding differences in protein
331 abundances in SP between HP and LP boars.

332 It was observed that the two classes of boars were significantly different
333 regarding PM and total piglets born. The spermatozoa of HP boars were capable of
334 maintaining the PM above 70 % during all time points analyzed and also showed
335 more total piglets born even though using a single IA with 1.5×10^9 spermatozoa
336 per dose. The LP boars showed lower PM than HP boars and the probable cause for
337 this could be due an instability of the sperm membrane during the cooling and
338 storage, due to an alteration of the membrane fluidity (JOHNSON *et al.*, 2000;
339 GACZARZEWICZ *et al.*, 2015), which causes an irreversible change in the membrane
340 proteins, and the destabilization of the plasma membrane compromises the sperm
341 viability and reduces the fertile ability (YESTE, 2017). However, the differences in
342 the SP proteomes between HP and LP boars could elucidate the sperm resistance to
343 liquid storage at 17°C.

344 Indeed, a difference between the protein profiles of SP from HP and LP was
345 found. Besides that, ten proteins were differentially expressed between the class of
346 boars. In the current study, the proteins seminal plasma sperm motility inhibitor
347 (SPMI), zona pellucida-binding protein 1 (ZPBP), hemopexin (HPX), complement
348 component 3 (C3) and fibronectin (FN1) in the seminal plasma were associated
349 with ejaculates from HP boars that presented at least 70% of progressive motility
350 after five days of storage at 17 °C and more total piglets born compared with LP
351 boars. On the other hand, the LP boars that showed reduced motility (<70% at 5°
352 day of storage) and reduced number of piglets showed more beta-2-microglobulin
353 (B2M), collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), homeobox protein Nkx-3.2

354 (NKX3-2), myelin protein zero-like protein 1 (MPZL1) and Keratin type II
355 cytoskeletal 1(KRT1).

356 The proteins in the SP have many functions related to sperm development,
357 maturation, transport, and survival in the female reproductive tract, as well as
358 capacitation and acrosome reaction, sperm-egg recognition, and protection against
359 microbial and oxidative damages (STRZEZEK *et al.*, 2005; NOVAK *et al.*, 2010;
360 GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014). In the current study, the most abundant proteins
361 of the seminal plasma fluid belong to the spermadhesin family (PSP-I, PSP-II,
362 AWN, AQN-1, AQN-3, and SPMI). They represent 93 % of the total protein
363 identified. This result is in accordance with Caballero *et al.* (2008); Gonzalez-
364 Cadavid *et al.* (2014) which observed greater abundance for these proteins in the
365 seminal plasma. The spermadhesins have a relevant function in sperm capacitation,
366 sperm-oocyte interaction and in modulating the uterine immune environment for
367 later successful embryo development (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; PÉREZ-
368 PATIÑO *et al.*, 2018). Previous studies have evaluated the relationship between some
369 of these SP spermadhesins and boar fertility (NOVAK *et al.*, 2010; MAY *et al.*, 2015).
370 In the current study, the SPMI was differentially expressed in SP samples of HP
371 boars, showing higher motility during the storage time and total piglets born.
372 However, in human, the SPMI in the SP was associated with a reduction of motility
373 (IWAMOTO *et al.*, 1993) and in swine, in capacitated spermatozoa, it also had a
374 negative relationship with litter size (KWON *et al.*, 2015). However, these same
375 authors could not explain its effect. SPMI is part of the spermadhesin family and is
376 secreted exclusively from seminal vesicles and exhibit high homology with
377 carbohydrate-binding protein AQN-3 (FEUGANG *et al.*, 2018; DRUART *et al.*, 2019).
378 In another study, it was observed that the protein AQN-3 demonstrated association
379 with high fertility (MAY *et al.*, 2015), and in our study the same relationship of the

380 AQN-3 with fertility was observed. It is because this protein is associated with the
381 sperm head surface at ejaculation (DOSTÀLOVÀ *et al.*, 1994) and is responsible for
382 binding plasma membrane of the boar spermatozoa and acting as sperm receptor of
383 the oocyte zona pellucida protein (VAN GESTEL *et al.*, 2007). Therefore, it may
384 explain the superior number in total piglets born for HP boars. In addition, in a
385 recent study, another sperm spermadhesin (PSP-I) was associated with sperm
386 cooling resistance (DE LAZARI *et al.*, 2019). The authors suggest that PSP-I appears
387 in a protective effect in the spermatozoa through the stabilization in the sperm
388 plasma membrane due to the adhesion of protein, and this could prevent the early
389 capacitation of spermatozoa and thus, maintain de sperm cells viable for long
390 storage time.

391 Another protein highly expressed in the HP boars was the zona pellucida
392 binding protein 1 (ZPBP1). To our knowledge this is the first time in which the
393 ZPBP1 was identified in the SP in swine, although it was recently identified in
394 spermatozoa from the cauda epididymis (WEBER *et al.*, 2019). The ZPBP1 and other
395 yet unknown acrosomal proteins, play important roles in the complex fertilization
396 process (TARDIF *et al.*, 2010). Furthermore, this protein probably interacts with
397 multiple acrosomal matrix proteins; by binding to the oocyte zona pellucida protein
398 following the acrosome reaction (YATSENKO *et al.*, 2012). Besides, *in silico*
399 analysis showed the interaction of ZPBP1 with SPMI, and this may have a
400 significant influence on the results for total piglets born in the class of HP boars
401 because the ZPBP1 is responsible for the initial sperm binding and the subsequent
402 induction of the acrosome reaction that allows sperm penetration (LIN *et al.*, 2007).

403 Another protein more expressed in the seminal plasma of the HP boars was
404 the hemopexin (HPX). This protein has functioned as a scavenger of free heme and

405 acts as an antioxidant in mammalian seminal plasma (NYNCA *et al.*, 2017). Free
406 heme is a potential source of iron that is toxic for cells and catalyzes the formation
407 of free radicals (VÍLCHEZ *et al.*, 2016). The iron (Fe) induced oxidative stress may
408 induce lipid peroxidation, which has been shown to lead to the deterioration of
409 sperm motility (KASPERCZYK *et al.*, 2016), it is also an essential ion to pathogenic
410 microorganisms (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014). Therefore, this protein could
411 play a role as antioxidant and antimicrobial, thus, maintaining the sperm motility in
412 the semen doses from the HP boars.

413 The fibronectin 1 (FN1) is an abundant soluble constituent in the SP, and it
414 was overexpressed in the post-sperm rich fraction in boars (PÉREZ-PATIÑO *et al.*,
415 2016). It is a cell adhesion glycoprotein and is considered a good marker for sperm
416 freezability (VILAGRAN *et al.*, 2015). Besides, this protein also was associated with
417 midpiece and tail sperm defects (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014). In our study,
418 the HP boars showed high expression for this protein, and the sperm cells of these
419 boars showed higher motility during storage time. According to Gonzalez-Cadavid
420 *et al.* (2014), the FN1 binding to the plasma membrane protects sperm cells and
421 also could play a role as an antioxidant when interacts with albumin. Therefore, this
422 suggests the FN1 as a biomarker for resistance to storage time in swine.

423 In our study, the component complement 3 (C3) was overexpressed in HP
424 boars. The C3 was previously identified in the seminal plasma of boars, and it
425 showed participation in the regulation of the immune system (GONZALEZ-CADAVID
426 *et al.*, 2014), and it is a component of the innate immune system (GEORGIU *et al.*,
427 2011). The C3 is a component of the three main pathways of the complement
428 system activation. It is hydrolyzed to form active products (I.e., C3b) which acts in
429 pathogen binding and elimination (DORUS *et al.*, 2012). According to Schulze *et al.*
430 (2019), the bacterial killing activity in ejaculates (is manifested through a reduction

431 or even inhibition of bacteria) was mediated by antibacterial proteins and the
432 potential involvement in this activity could be mediated by C3 (SCHULZE *et al.*,
433 2019). Thus, HP boars could be more capable of defending against bacteria in
434 semen doses because it is known that bacterial contamination leads to the decline
435 in motility during storage time. However, it is worth mentioning that the LP boars
436 showed more agglutinated doses (data not shown) than HP boars. It is an interesting
437 issue to point out considering that agglutination is related to bacterial contamination
438 (GOLDBERG *et al.*, 2013). Another possible explanation for the HP boars better
439 fertility results could be due to the interaction between C3 and FN1. In humans, the
440 FN1 activates C3 receptors on the segment of the membrane to which it binds
441 (WRIGHT *et al.*, 1983), and this could provide an increase of the adhesion of the
442 immunity cells. However, we do not know if this interaction occurs in the seminal
443 plasma or semen doses.

444 For the SP proteins found in LP boars, the Keratin type II cytoskeletal 1
445 (KRT1) was differently identified in LP boars. This protein was previously
446 identified in human spermatozoa (DE MATEO *et al.*, 2007). However, the authors do
447 not know the function of the protein on the reproductive characteristic. The main
448 function of this protein is to protect the epithelial cells by providing structural and
449 mechanical support due to the stabilization of the sperm tail (KIERSZENBAUM *et al.*,
450 2003). Nevertheless, a recent study (PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2018) identified
451 overexpression of the keratin type I cytoskeletal 10 protein (KTR10) and under-
452 expression keratin type I cytoskeletal 17 (KRT17) protein in boars that showed high
453 farrowing rate (range 89 to 91%). The authors suggest that the keratin protein could
454 be involved with sperm motility. However, in our study, the presence of KTR1 in
455 the SP of the group of boars that showed lower motility during the storage time

456 suggests that this protein did not participate in sperm motility, as suggested by
457 Pérez-Patiño *et al.* (2018). Therefore, one possible effect could be attributed to
458 structural and mechanical support for the stabilization of the sperm tail provided by
459 keratin protein (KIERSZENBAUM *et al.*, 2003).

460 The myelin protein zero-like protein 1 (MPZL1) is a glycoprotein involved
461 in extracellular matrix-induced signal transduction (BEIGBEDER *et al.*, 2017). This
462 protein is a member of the immunoglobulin superfamily, which is characterized by
463 extracellular regions that contain immunoglobulin (Ig)-like domains (YU *et al.*,
464 2018). This protein in previous studies was expressed in adenocarcinoma (CHEN *et*
465 *al.*, 2014) and hepatocellular carcinoma (YU *et al.*, 2018). In a recent study, this
466 protein was identified in the sperm-rich ejaculate fraction of swine and associated
467 with spermatogenesis (PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2016). The MPZL also was associated
468 with spermatogenesis in mice (NAKATA *et al.*, 2012). These authors observed that
469 the MPZL only was expressed when another protein (Cadm1) was deficient, and
470 they suggested that this protein plays a role of adhesion between spermatogenic
471 cells and somatic Sertoli cells (NAKATA *et al.*, 2012).

472 To the best of our knowledge, this is the first time in which the homeobox
473 protein Nkx-3.2 (NKX3-2) was identified in seminal plasma of swine and
474 associated with the LP boars with low motility and total piglets born. According to
475 the gene ontology, this protein is present in the nuclear chromatin (GO: 0000790)
476 and plays the role of DNA-binding (GO:0000255) in humans. However, in a
477 previous study, this protein was highly expressed in the arteries, digestive tract, and
478 skeletal structures of chicken embryos (NISHIDA *et al.*, 2002). Thus, with this
479 background, additional studies must elucidate the influence of the NKX3-2 in the
480 seminal plasma of boars with a low resistance to storage time and low fertility.

481 The seminal plasma of LP boars showed more beta 2-microglobulin (B2M)
482 expressed. B2M was previously identified in the seminal vesicle fluid of bulls
483 (REGO *et al.*, 2014; WESTFALEWICZ *et al.*, 2017), and it was found in the post-
484 acrosomal region of human sperm (FELLOUS *et al.*, 1976) and its expression in
485 seminal fluid had an inverse correlation with the number of sperm in the ejaculated
486 (CHARD *et al.*, 1991) and this phenomenon has no explanation (DAVALIEVA *et al.*,
487 2012). In men, this protein was also associated with azoospermia, asthenospermia,
488 oligozoospermia (DAVALIEVA *et al.*, 2012), and infertility (ULEOVA-GALLOVA *et*
489 *al.*, 1999). In this study, this protein was also observed in boars with less fertility.
490 In humans (DAVALIEVA *et al.*, 2012), the B2M has a strong potential to be used as
491 a marker for evaluation of fertility which also may be considered for boar fertility
492 in the future.

493 Collagen type I alpha 1 chain (COL1A1) was identified in seminal plasma
494 rainbow trout (NYNCA *et al.*, 2017). In this study, the COL1A1 was more expressed
495 in the seminal plasma of LP boars. This protein belongs to a family of extracellular
496 matrix proteins that play an important component in maintaining normal
497 spermatogonia homeostasis during spermatogenesis (CHEN *et al.*, 2012). In the
498 study by (PEREZ-PATIÑO *et al.*, 2019) it was observed the COL18A1, this collagen
499 protein belongs to the same family that COL1A1. The COL18A1 was
500 overexpressed in man with spermatogenic dysfunction (DOBASHI *et al.*, 2003).
501 Therefore, it is possible to suggest that the COL1A1 protein could indicate the
502 beginning of a probable loss of sperm quality.

503 It is known that the presence of low fertility boars in AI centers is an
504 underestimated problem with little information. The overall result presented in this
505 study has provided evidence for differences in fertility between HP and LP boars.

506 However, the proteins overexpressed in HP boars were not observed in other studies
507 (NOVAK *et al.*, 2010; PÉREZ-PATIÑO *et al.*, 2018) likely due to genetic differences
508 among the boars used in the different studies. Besides, the seminal plasma is a
509 dynamic fluid whose protein composition can be influenced by many factors
510 (PARRILLA *et al.*, 2019). Although the prediction of fertility using biomarkers in
511 semen has long been a wish of academics and swine industry (PÉREZ-PATIÑO *et al.*,
512 2018), further studies are needed to provide evidence on the relation of the proteins
513 with boar fertility.

514

515 **5. Conclusions**

516 To our knowledge, the differentially expressed proteins in seminal plasma
517 could play important roles in boar fertility. We discovered 10 candidates for
518 biomarkers associated with resistance to cooling at 17°C and indirectly with total
519 piglets born. Five proteins (SPMI, ZPBP1, FN1, HPX and C3) in the seminal
520 plasma could serve as predictors of “good” boar fertility and the other five proteins
521 could serve as “bad” (B2M, COL1A1, NKX3-2, MPZL1 and KRT1). However, we
522 still do not know the full roles of the differentially expressed proteins. Therefore,
523 more studies will be necessary for the validation of these proteins as biomarkers for
524 swine fertility.

525

526 **Conflict of interest**

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

528

529 **Acknowledgments**

530 The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de
531 Pessoal de Nível Superior - Brazil), Agrocere PIC Brazil group for the financial

532 support and to the Master Agroindustrial Company for providing the facilities to
533 perform this study.

534

535 **References**

536

537 BEIGBEDER, A.; CHARTIER, F. J. M.; BISSON, N. MPZL1 forms a signalling
538 complex with GRB2 adaptor and PTPN11 phosphatase in HER2-positive breast
539 cancer cells. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 11514, 2017. DOI:10.1038/s41598-
540 017-11876-9

541

542 BUSTAMANTE-FILHO, I. *et al.* Semen evaluation in the boar: use of proteomic
543 analyses. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 43, n. 2, p. 184-195, 2019.

544

545 BUSTAMANTE-FILHO, I. C. *et al.* Recombinant expression and purification of
546 the bovine acidic Seminal Fluid Protein. **Animal Reproduction (AR)**. v. 11, n. 2,
547 p. 96-103, 2014.

548

549 CABALLERO, I. *et al.* Major proteins of boar seminal plasma as a tool for
550 biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p.
551 1352-1355, 2008. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.07.013

552

553 CHARD, T. *et al.* The concentrations of transferrin, β 2-microglobulin, and albumin
554 in seminal plasma in relation to sperm count. **Fertility and Sterility**. v. 55, n. 1, p.
555 211-213, 1991. DOI:10.1016/S0015-0282(16)54087-4

556

557 CHEN, R. *et al.* A Meta-analysis of Lung Cancer Gene Expression Identifies PTK7
558 as a Survival Gene in Lung Adenocarcinoma. **Cancer Research**. v. 74, n. 10, p.
559 2892, 2014. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-2775

560

561 CHEN, S.-H.; LI, D.; XU, C. Downregulation of Colla1 induces differentiation in
562 mouse spermatogonia. **Asian journal of andrology**. v. 14, n. 6, p. 842, 2012.
563 DOI:10.1038/aja.2012.66

564

565 DAVALIEVA, K. *et al.* Proteomic analysis of seminal plasma in men with
566 different spermatogenic impairment. **Andrologia**. v. 44, n. 4, p. 256-264, 2012.
567 DOI:10.1111/j.1439-0272.2012.01275.x

568

569 DE LAZARI, F. L. *et al.* Proteomic identification of boar seminal plasma proteins
570 related to sperm resistance to cooling at 17°C. **Theriogenology**. 2019.
571 DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.11.023

572

573 DE LAZARI, F. L. *et al.* Seminal plasma proteins and their relationship with sperm
574 motility and morphology in boars. **Andrologia**. p. e13222, 2018.
575 DOI:10.1111/and.13222

576

- 577 DE MATEO, S. *et al.* Marked correlations in protein expression identified by
578 proteomic analysis of human spermatozoa. **Proteomics**. v. 7, n. 23, p. 4264-4277,
579 2007. DOI:10.1002/pmic.200700521
580
- 581 DOBASHI, M. *et al.* Distribution of type IV collagen subtypes in human testes and
582 their association with spermatogenesis. **Fertility and Sterility**. v. 80, p. 755-760,
583 2003. DOI:10.1016/S0015-0282(03)00775-1
584
- 585 DORUS, S.; SKERGET, S.; KARR, T. L. Proteomic discovery of diverse immunity
586 molecules in mammalian spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive**
587 **Medicine**. v. 58, n. 4, p. 218-228, 2012. DOI:10.3109/19396368.2012.700442
588
- 589 DOSTÀLOVÀ, Z. *et al.* Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland
590 fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa.
591 **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v. 1200, n. 1, p. 48-54,
592 1994. DOI:10.1016/0304-4165(94)90026-4
593
- 594 DRUART, X. *et al.* Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility.
595 **Theriogenology**. v. 137, p. 30-35, 2019.
596 DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.034
597
- 598 DYCK, M. *et al.* Biological markers of boar fertility. **Reproduction in Domestic**
599 **Animals**. v. 46, n. s2, p. 55-58, 2011. DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01837.x
600
- 601 FELLOUS, M.; COLLE, A.; TONNELLE, C. The expression of human beta2
602 microglobulin on human spermatozoa. **European Journal of Immunology**. v. 6,
603 n. 1, p. 21-24, 1976. DOI:10.1002/eji.1830060106
604
- 605 FEUGANG, J. M. *et al.* In-depth proteomic analysis of boar spermatozoa through
606 shotgun and gel-based methods. **BMC genomics**. v. 19, n. 1, p. 62, 2018.
607 DOI:10.1186/s12864-018-4442-2
608
- 609 FLOWERS, W.; DELLER, F.; STEWART, K. Use of heterospermic inseminations
610 and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits
611 and seminal plasma proteins in boar fertility. **Animal Reproduction Science**. v.
612 174, p. 123-131, 2016. DOI:10.1016/j.anireprosci.2016.09.016
613
- 614 FOXCROFT, G. *et al.* Identifying useable semen. **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p.
615 1324-1336, 2008. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.07.015
616
- 617 FOXCROFT, G. R. *et al.* Application of advanced AI technologies to improve the
618 competitiveness of the pork industry. *In: Proceedings of the 21st IPVS Congress,*
619 *2010, Vancouver, Canada. Vancouver: Hein Jonker Media Management, 2010 july*
620 *18-21. p. 18-21*
621
- 622 GACZARZEWICZ, D. *et al.* Storage temperature of boar semen and its
623 relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial
624 membrane potential, and oxidoreductive capability. **Turkish Journal of Biology**.
625 v. 39, n. 4, p. 582-594, 2015. DOI:10.3906/biy-1412-76
626

- 627 GEORGIU, A. S. *et al.* Effects of Complement Component 3 Derivatives on Pig
628 Oocyte Maturation, Fertilization and Early Embryo Development In Vitro.
629 **Reproduction in Domestic Animals.** v. 46, n. 6, p. 1017-1021, 2011.
630 DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01777.x
631
- 632 GOLDBERG, A. M. G. *et al.* Risk factors for bacterial contamination during boar
633 semen collection. **Research in Veterinary Science.** v. 95, n. 2, p. 362-367, 2013.
634 DOI:10.1016/j.rvsc.2013.06.022
635
- 636 GONZALEZ-CADAVID, V. *et al.* Seminal plasma proteins of adult boars and
637 correlations with sperm parameters. **Theriogenology.** v. 82, n. 5, p. 697-707, 2014.
638 DOI:10.1016/j.theriogenology.2014.05.024
639
- 640 IWAMOTO, T. *et al.* Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal
641 plasma. **Molecular Reproduction and Development.** v. 36, n. 4, p. 475-481, 1993.
642
- 643 JOHNSON, L. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science.** v.
644 62, n. 1, p. 143-172, 2000. DOI:10.1016/S0378-4320(00)00157-3
645
- 646 KASPERCZYK, A. *et al.* Influence of iron on sperm motility and selected
647 oxidative stress parameters in fertile males-a pilot study. **Annals of Agricultural
648 and Environmental Medicine.** v. 23, n. 2, 2016.
649
- 650 KIERSZENBAUM, A. L.; RIVKIN, E.; TRES, L. L. Acroplaxome, an F-actin-
651 keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the
652 spermatid head. **Molecular biology of the cell.** v. 14, n. 11, p. 4628-4640, 2003.
653
- 654 KNOX, R. *et al.* Synchronization of ovulation and fertility in weaned sows treated
655 with intravaginal triptorelin is influenced by timing of administration and follicle
656 size. **Theriogenology.** v. 75, n. 2, p. 308-319, 2011.
657 DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.09.001
658
- 659 KWON, W.-S. *et al.* Increased male fertility using fertility-related biomarkers.
660 **Scientific Reports.** v. 5, n. 1, p. 15654, 2015. DOI:10.1038/srep15654
661
- 662 LIN, Y.-N. *et al.* Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix
663 disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. **Molecular and cellular
664 biology.** v. 27, n. 19, p. 6794-6805, 2007. DOI:10.1128/MCB.01029-07
665
- 666 MAY, N. *et al.* Seminal plasma proteins associated with boar fertility. *In:*
667 International Conference on Boar Semen Preservation, VIIIth ed., 2015,
668 Champaign. **Proceedings** Champaign, Illinois, USA: Wiley Blackwell, 2015 Aug
669 9-12. p. 114
670
- 671 NAKATA, H. *et al.* Compensatory Upregulation of Myelin Protein Zero-Like 2
672 Expression in Spermatogenic Cells in Cell Adhesion Molecule-1-Deficient Mice.
673 **Acta Histochemica Et Cytochemica.** v. 45, n. 1, p. 47-56, 2012.
674 DOI:10.1267/ahc.11057
675

- 676 NISHIDA, W. *et al.* A triad of serum response factor and the GATA and NK
677 families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. **Journal of**
678 **Biological Chemistry.** v. 277, n. 9, p. 7308-7317, 2002.
679 DOI:10.1074/jbc.M111824200
680
- 681 NOVAK, S. *et al.* Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility
682 in boars. **Journal of Andrology.** v. 31, n. 2, p. 188-200, 2010.
683 DOI:10.2164/jandrol.109.007583
684
- 685 NYNCA, J. *et al.* Proteomic identification of rainbow trout blood plasma proteins
686 and their relationship to seminal plasma proteins. **Proteomics.** v. 17, n. 11, p.
687 1600460, 2017. DOI:10.1002/pmic.201600460
688
- 689 PARRILLA, I. *et al.* Boar semen proteomics and sperm preservation.
690 **Theriogenology.** v. 137, p. 23-29, 2019.
691 DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.033
692
- 693 PÉREZ-PATIÑO, C. *et al.* Characterization of the porcine seminal plasma
694 proteome comparing ejaculate portions. **Journal of proteomics.** v. 142, p. 15-23,
695 2016. DOI:10.1016/j.jprot.2016.04.026
696
- 697 PÉREZ-PATIÑO, C. *et al.* New In-Depth Analytical Approach of the Porcine
698 Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. **Journal of**
699 **Proteome Research.** v. 17, n. 3, p. 1065-1076, 2018.
700 DOI:10.1021/acs.jproteome.7b00728
701
- 702 PEREZ-PATIÑO, C. *et al.* The proteome of pig spermatozoa is remodeled during
703 ejaculation. **Molecular & Cellular Proteomics.** v. 18, n. 1, p. 41-50, 2019.
704 DOI:10.1074/mcp.RA118.000840
705
- 706 RECUERO, S. *et al.* Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-
707 thawed boar spermatozoa. **Theriogenology.** 2019.
708 DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.035
709
- 710 REGO, J. P. A. *et al.* Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus*
711 bulls. **Animal Reproduction Science.** v. 148, n. 1, p. 1-17, 2014.
712 DOI:10.1016/j.anireprosci.2014.04.016
713
- 714 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. *et al.* Seminal plasma proteins: what role do they
715 play? **American Journal of Reproductive Immunology.** v. 66, n. (Suppl. 1), p.
716 11-22, 2011. DOI:10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x
717
- 718 RUIZ-SANCHEZ, A. L. *et al.* The predictive value of routine semen evaluation
719 and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology.** v. 66,
720 n. 4, p. 736-748, 2006. DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.12.012
721
- 722 SCHULZE, M. *et al.* Antibacterial defense and sperm quality in boar ejaculates.
723 **Journal of Reproductive Immunology.** v. 131, p. 13-20, 2019.
724 DOI:10.1016/j.jri.2018.11.001
725

- 726 STRZEZEK, J. *et al.* Proteomics of boar seminal plasma—current studies and
727 possibility of their application in biotechnology of animal reproduction.
728 **Reproductive Biology**. v. 5, n. 3, p. 279-290, 2005.
729
- 730 TARDIF, S. *et al.* Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion
731 to the egg zona pellucida. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 32, p.
732 24863-24870, 2010. DOI:10.1074/jbc.M110.123125
733
- 734 ULEOVA-GALLOVA, Z. *et al.* Immunity to spermatozoa and male fertility.
735 **Andrologia**. v. 31, n. 5, p. 318-319, 1999.
736
- 737 VAN GESTEL, R. A. *et al.* Multiple proteins present in purified porcine sperm
738 apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. **Molecular**
739 **Human Reproduction**. v. 13, n. 7, p. 445-454, 2007.
740 DOI:10.1093/molehr/gam030
741
- 742 VILAGRAN, I. *et al.* Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from
743 different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm
744 freezability marker. **Andrology**. v. 3, n. 2, p. 345-356, 2015.
745 DOI:10.1111/andr.12009
746
- 747 VÍLCHEZ, M. C. *et al.* Identification of the major proteins present in the seminal
748 plasma of European eel, and how hormonal treatment affects their evolution.
749 Correlation with sperm quality. **Comparative Biochemistry and Physiology Part**
750 **A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 201, p. 37-45, 2016.
751 DOI:10.1016/j.cbpa.2016.06.025
752
- 753 WABERSKI, D. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial
754 insemination: past, present and future challenges. **Theriogenology**. v. 137, p. 2-7,
755 2019. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.030
756
- 757 WEBER, A. *et al.* Ready for the journey: a comparative proteome profiling of
758 porcine cauda epididymal fluid and spermatozoa. **Cell and Tissue Research**. 2019.
759 DOI:10.1007/s00441-019-03080-0
760
- 761 WESTFALEWICZ, B. *et al.* Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid
762 proteome in relation to seminal plasma proteome. **Journal of Dairy Science**. v.
763 100, n. 3, p. 2282-2298, 2017. DOI:10.3168/jds.2016-11866
764
- 765 WRIGHT, S. D.; CRAIGMYLE, L. S.; SILVERSTEIN, S. C. Fibronectin and
766 serum amyloid P component stimulate C3b-and C3bi-mediated phagocytosis in
767 cultured human monocytes. **The Journal of experimental medicine**. v. 158, n. 4,
768 p. 1338-1343, 1983.
769
- 770 YATSENKO, A. N. *et al.* Association of mutations in the zona pellucida binding
771 protein 1 (ZPBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men.
772 **Molecular Human Reproduction**. v. 18, n. 1, p. 14-21, 2012.
773 DOI:10.1093/molehr/gar057
774

- 775 YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state.
776 **Animal Reproduction.** v. 14, n. 1, p. 69-81, 2017. DOI:10.21451/1984-3143-
777 AR895
778
- 779 YU, T. *et al.* Structural and biochemical studies of the extracellular domain of
780 Myelin protein zero-like protein 1. **Biochemical and biophysical research**
781 **communications.** v. 506, n. 4, p. 883-890, 2018. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.10.161
782

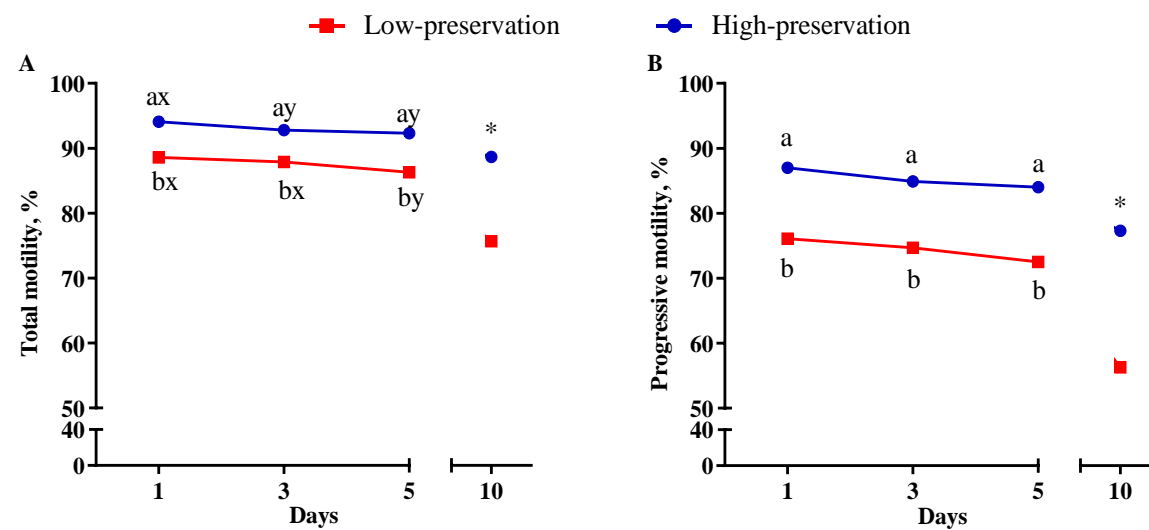


Figure 1. Total (A) and progressive (B) sperm motility of low- and high-preservation boars during 10 days of storage.

ab: indicate difference considering the class of boar ($P < 0.01$).

xy: indicate difference considering storage time ($P < 0.01$)

*: indicate difference only considering the 10^o day of storage ($P < 0.01$)

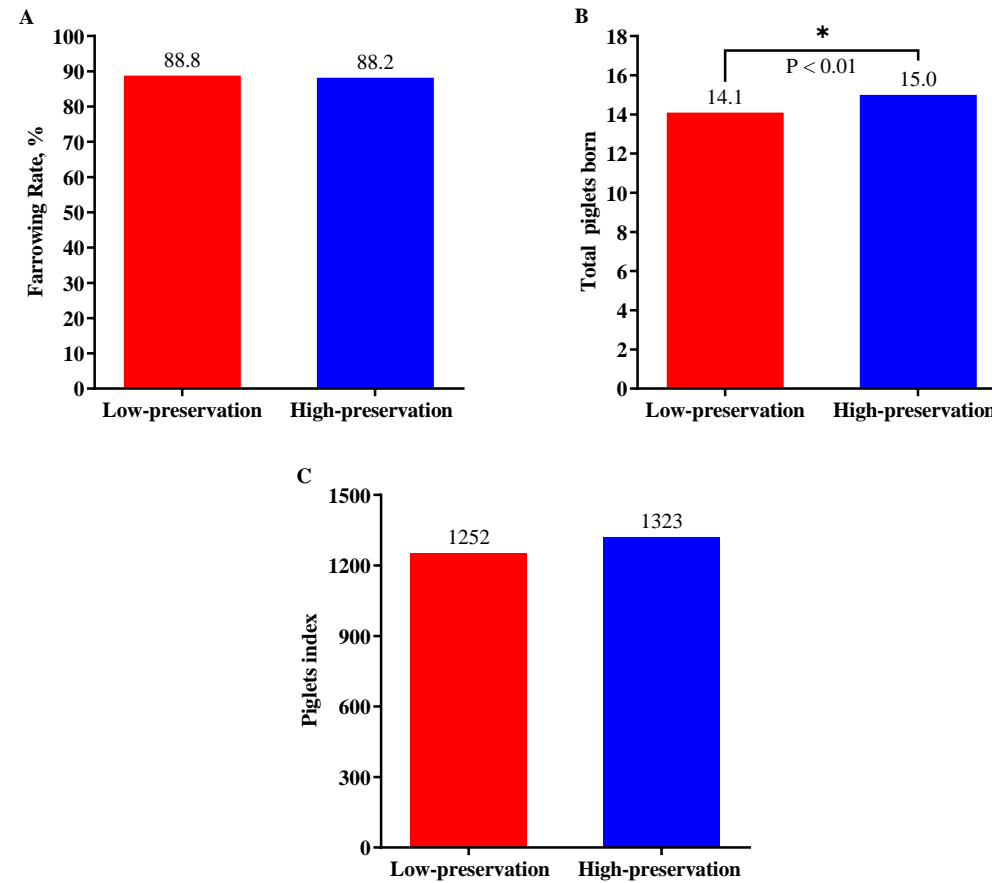


Figure 2. The average of farrowing rate (A), total piglets born (B), and piglets index (C) for low- and high-preservation boars to semen storage at 17°C.

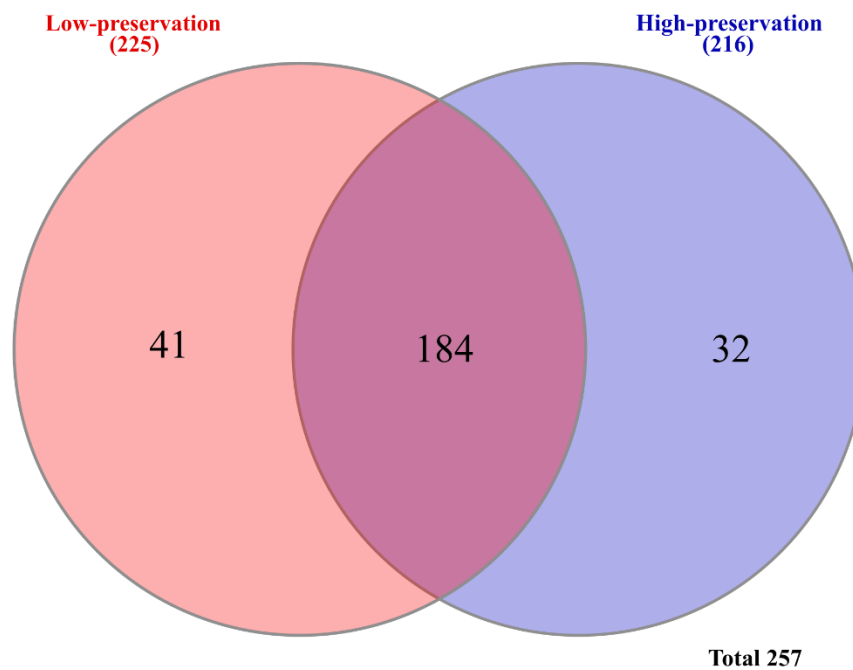


Figure 3. Venn diagram showing the distribution of identified proteins in low- and high-preservation boars to semen storage at 17°C.

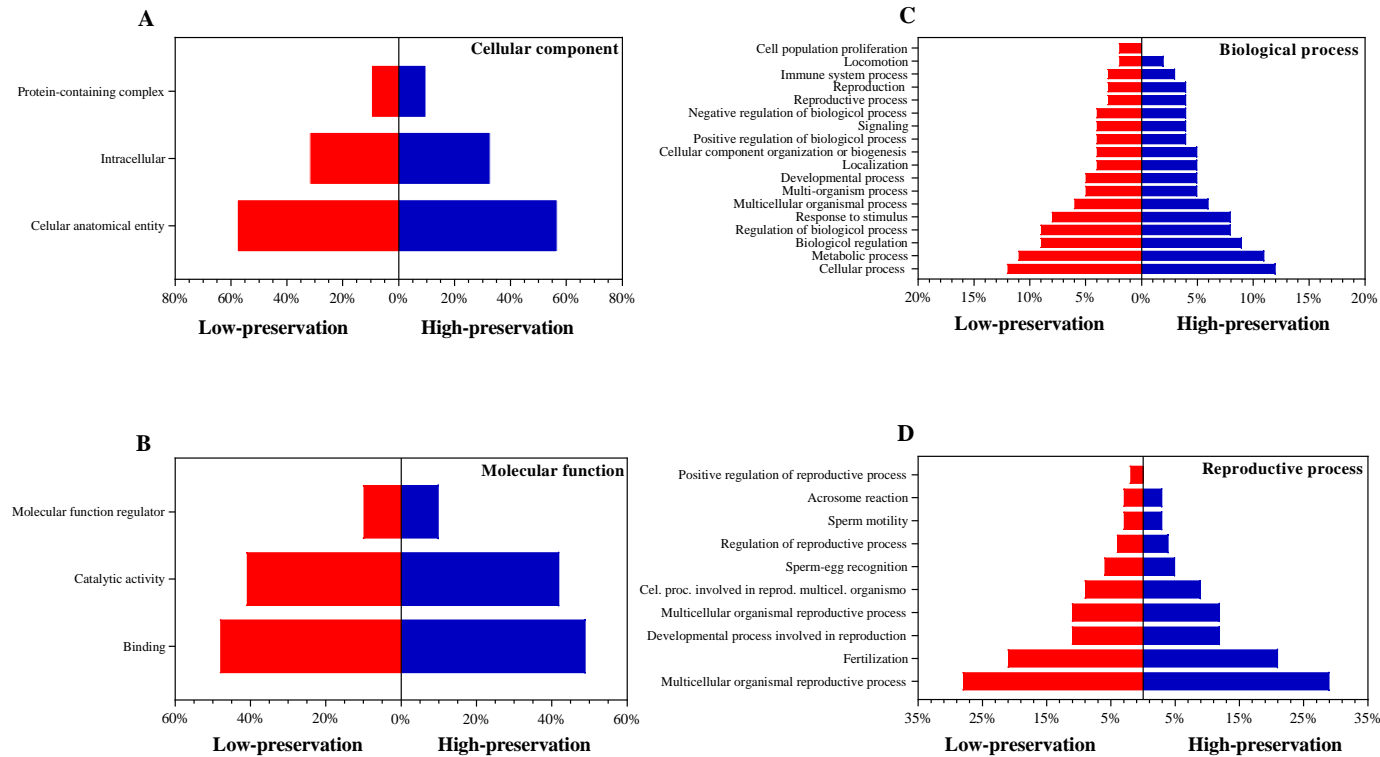


Figure 4. Frequency distribution of proteins identified in seminal plasma of the boars classified as low- and high-preservation to semen storage at 17°C associated to (A) cellular component, (B) molecular function, (C) biological process and (D) reproductive process (level 2) using Blas2Go software.

High-preservation boars: Class of boars that had more than 70% of PM on day 5 of storage at 17°C.

Low-Preservation boars: Class of boars that had less than 70% of PM on day 5 of storage at 17°C.

Table 1. Proteins differently expressed in the seminal plasma of the boars classified as low- and high-preservation to semen storage at 17°C with a fold change ≥ 1.5 among.

Protein name	Taxonomy*	Accession	MW (kDa)/PI	Sequence Coverage (%)	emPAI	Fold Change (log2)
Up-regulated in the HP group						
Zona pellucida-binding protein 1	<i>S scrofa</i>	F1SF28	39.58/9.03	12.00	0.52	1.70
Hemopexin	<i>S scrofa</i>	F1RMN7	51.18/6.96	7.62	0.19	1.61
Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>S scrofa</i>	I7HJH6	15.02/8.88	69.34	128.15	1.58
Complement component 3	<i>S scrofa</i>	F1SBS4	186.91/6.54	8.85	0.33	1.52
Fibronectin	<i>E caballus</i>	F1SS24	270.42/5.60	46.62	0.52	1.50
Up-regulated proteins in the LP group						
Keratin, type II cytoskeletal 1	<i>H sapiens</i>	F1SGG3	64.83/8.15	1.92	0.06	1.50
Myelin protein zero-like protein 1	<i>B taurus</i>	F1RPU6	29.22/8.9	8.17	0.63	1.56
Homeobox protein Nkx-3.2	<i>H sapiens</i>	A0A286ZVB8	34.88/8.09	10.68	0.14	1.58
Collagen type I alpha 1 chain	<i>S scrofa</i>	A0A287A1S6	139.21/5.78	2.86	0.03	2.27
Beta-2-microglobulin	<i>S scrofa</i>	A0A287B7B9	15.65/6.06	8.57	1.15	2.44

* When a given identified protein was uncharacterized, a blast was performed in order to verify the other proteins of other species with sequence homology (>80%).

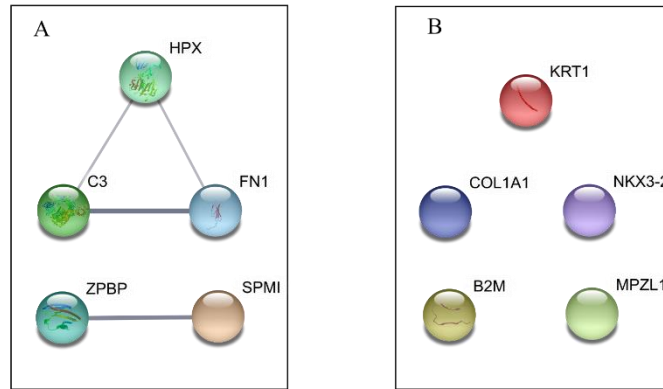


Figure 5. Interaction analysis of seminal plasma proteins with fold change difference between high-preservation (A) and low-preservation boars (B) during storage time at 17°C generated with the STRING v.11 database program.

The interaction search was restricted to *Sus scrofa* protein pairs. ZPBP - zona pellucida-binding protein 1; SPMI - seminal plasma sperm motility inhibitor; HPX – hemopexin; C3 – component complement 3; FN1 – fibronectin; B2M - beta-2-microglobulin; COL1A1 - collagen type I alpha 1 chain; NKX3-2 - homeobox protein Nkx-3.2; MPZL1 - myelin protein zero-like protein 1; KRT1 - Keratin, type II cytoskeletal 1. The line size indicates a high interaction score (tight lines indicate a high score > 0.8; thin lines indicate an average score > 0.4).

CAPÍTULO V – QUARTO MANUSCRITO

*REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF SOWS INSEMINATED WITH SEMEN
DOSES STORED FOR UP TO SEVEN DAYS IN LONG-TERM EXTENDER IN A
FIELD CONDITION*

MANUSCRITO ACEITO NO PERIÓDICO
ANIMAL REPRODUCTION
(de acordo com as normas do periódico)

Reproductive performance of sows inseminated with semen doses stored for up to seven days in long-term extender in a field condition

Matheus Schardong Lucca¹, Rafael da Rosa Ulguim¹, Fernando Pandolfo Bortolozzo¹, Ivo Wentz¹, Janaina Colecha Rocha², Mayara Corrêa Dias de Souza², Roberto Vasconcelos Escobar², Kerlin Calderam², Pedro Ivo de Quadros Filho², Raquel Ausejo Marcos³.

¹Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

²Bretanha Importação e Exportação, Passo Fundo-RS, Brasil.

³Magapor S.L., Zaragoza, España.

*Correspondence: Fernando Pandolfo Bortolozzo, fpbortol@ufrgs.br, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de veterinária, CEP 91540-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

This study aimed to evaluate the reproductive performance of sows inseminated with semen doses preserved at 15-18°C for up to seven days in long-term extender (Duragen[®]). Parity one (PO1) to PO7 sows were randomly assigned to the following groups: AI1-3 (n=190), insemination with semen doses stored between one and three days; and AI5-7 (n=124), insemination with semen doses stored between five and seven days. Sows were submitted to estrus detection twice a day. Post-cervical insemination according to weaning-to-estrus interval was performed. The farrowing rate (FR) did not differ between the groups (AI1-3=83.2 %; AI5-7=82.2 %; p>0.05) nor did the total number of piglets born (TPB; AI1-3=14.2±0.3; AI5-

7=14.5±0.3; $p>0.05$). Considering the semen dose most likely responsible for fertilization according to its storage time (1, 2–3, 5, and 6–7 days), the FR (72.7 %, 87.8 %, 85.7 %, and 79 %, respectively) and TPB (14.4, 14.0, 14.9, and 13.5, respectively) were similar among the groups ($p>0.05$). In conclusion, the use of semen doses extended with long-term extender stored for up to seven days did not impair the reproductive performance of sows. Therefore, it's using could optimize production efficiency and logistics of semen dose deliveries to sow farms.

Keywords: artificial insemination, boar stud, storage time

Introduction

In swine production, artificial insemination (AI) is used with liquid-stored semen. Extenders are used to increase the volume of the ejaculate, provide energy to sperm, protect against cold shock, maintain a stable pH, ensure an adequate osmotic pressure, and prevent bacterial growth during storage (Yeste, 2017). The extenders are divided into two main groups according to the capability of promoting the viability of sperm cells over time: short-term (up to three days) and long-term (more than four days) (Yeste, 2017). Despite this, usually, semen doses are used up to three days after collection in commercial conditions regardless of the extender (Pinart *et al.*, 2015).

The use of semen doses stored for a long time could bring a reduction in the frequency of semen delivery for each farm, therefore, optimizing the production logistics of the boar studs (Anil *et al.*, 2004). Additionally, there is little information on reproductive performance using semen doses stored for more than five days in a field condition, even when stored in long-term extenders. Therefore, this study

aimed to evaluate the reproductive performance of sows inseminated with semen doses preserved up to seven days in a long-term extender.

Materials and methods

All procedures were approved by the Ethics Committee (CEUA 34329/2018) of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Animals and farms

The experiment was performed during the winter in two commercial farms (boar stud and sow farm) located in Southern Brazil (Santa Catarina State). The animals were housed with partially slatted floor, automatic feeders, and *ad libitum* access to water. The boar stud had a temperature-controlled facility (18 – 23 °C) and in the sow farm the curtain management was used. The weaned sows were housed in individual crates until 50 days post-insemination and then were moved to gestation pens (10 sows/pen; 2.5 m²/sow). Five days before the expected farrowing date, they were moved to farrowing rooms.

Experimental design

A total of 314 multiparous weaned sows (Fertillis 25, Agrocere PIC[®], Patos de Minas, Brazil) were randomly assigned during five weeks according to parity (one to seven), weaning-to-estrus interval (WEI), previous number of total piglets born, and lactation length (18 to 26 days) into the following groups: AI1–3: sows inseminated with semen doses stored between one and three days; and AI5–7: sows inseminated with semen doses stored between five and seven days.

Semen processing, transport, and storage

Eight boars (Agroceres PIC[®]) were previously selected according to the ability for maintaining the total sperm motility above 70 % at day 8 of storage using the Duragen[®] extender (Magapor, Zaragoza, Spain). Boar sperm was collected weekly by the gloved hand method and immediately after the collection, sperm motility, morphology, and concentration were assessed by computerized semen analysis (Magavision[®]; Magapor, Zaragoza, Spain). Only ejaculates with a total motility ≥ 70 % and morphological defects < 20 % were processed. Each ejaculate was diluted in the one-step method to obtain blisters (Smallbag, Magapor, Zaragoza, Spain) with 1.25×10^9 viable sperm cells in 45 mL volume. Homospermic semen doses were produced from the same ejaculate (on split-sample basis); half of them were used between one and three days of storage and the other half was used between five and seven days of storage. The semen doses were transported in a thermal box and arrived at the sow farm approximately two hours after dilution and were stored at 15–18 °C. One sample from each group and boar was assessed daily for total motility under bright field microscopy (200 \times). Only doses with a total motility ≥ 70 % were used for AI.

Estrous detection and artificial insemination

Estrus detection was performed twice a day (at 7:30 am and 3:30 pm) starting at weaning by fence-line boar contact and back-pressure test. Heterospermic insemination using the post-cervical technique was performed based on the WEI according to the following protocol: one to three days of WEI, first insemination on the subsequent shift after estrus onset; four to six days of WEI, first insemination at estrus onset. Later inseminations were performed at 24 hours interval until the sow showed standing estrus. The pregnancy rate (PR), farrowing

rate (FR), the total number of piglets born (TPB), number of piglets born alive (BA), number of stillborns (SB), and the number mummified (MM) were recorded.

Ultrasonographic examination

A sub-sample of 247 sows was evaluated once a day in 24 h intervals from the onset of estrus until 24 h after the last AI to evaluate the occurrence of ovulation. The evaluation was performed by the same trained technician using a linear transrectal transducer (A6V, Sonoscape[®] Co. Ltda, Shenzhen, China, 5.5–8 MHz). The information obtained was used to identify the most probable semen dose responsible for fertilization. The most probable semen dose was considered to be the one infused right before ovulation. Based on this response, the reproductive performance was analyzed according to the storage time most probably responsible for fertilization as follows: 1, 2–3, 5, and 6–7 days of storage prior to insemination.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using *Statistical Analysis System* software (SAS, version 9.4) using the GLIMMIX procedure. The group of storage times was considered a fixed effect and the week a random effect. The frequency variables were analyzed using logistic regression in the binary distribution. Npar1way was used to analyze the percentage of stillborns and mummified. The averages were compared using the Tukey-Kramer test.

Results

On average, 2.6 ± 0.5 semen doses per/sow/estrus were used. Moreover, only 8.6 % of the batches of semen doses produced were discarded due to low motility (<70 %) for both groups. The reproductive performance was not affected ($p > 0.05$)

in sows in the group AI5–7 compared to AI1–3 (Table 1). Considering the semen dose that was most likely responsible for fertilization, the FR was not affected ($p>0.05$) when doses were used at 1 (72.7 %; 72/99), 2–3 (87.8 %; 43/49), 5 (85.7 %; 48/56), or 6–7 (79.0 %; 34/43) days of storage. The TPB also did not differ ($p>0.05$) when analyzed according to the semen dose responsible for fertilization (1 d = 14.4 ± 3.0 , 2–3 d = 14.0 ± 3.6 , 5 d = 14.9 ± 4.2 , and 6–7 d = 13.5 ± 3.9 ; mean \pm SD). No differences in FR or TPB were observed ($p>0.05$) when 1 vs 6–7 days were analyzed separately.

Discussion

This study challenged the use of semen doses in long-term extender and found no impairment of FR and TPB when doses were used up to seven days of storage in a field condition. In studies performed in the past, the use of semen doses stored beyond three days had reduced reproductive performance, regardless of the extender used (Waberski *et al.*, 1994). However, later experiments showed a satisfactory reproductive performance using doses stored for four to five days in long-term extender (Haugan *et al.*, 2007), which was corroborated by the results of the present study. This better performance in relation to past studies is possibly related to the current long-term extenders containing improved buffering agents, antioxidants, and antibiotics (Knox, 2016), which might be able to maintain sperm fertility for a longer period.

Few farms have used semen doses beyond four days of storage even when diluted in long-term extenders (Knox, 2016). Aiming to improve reproductive performance, some production systems routinely use the long-term extender within

two days of storage. However, no benefit has been observed compared to using short-term extenders (Pinart *et al.*, 2015).

Even though considering the differences between estrus detection and the first AI (based on the AI protocol used) we did not observe differences ($P \geq 0.50$) for FR and TPB according to different WEI (data not shown). Furthermore, the time for insemination to obtain better reproductive performance is up to 24 h before the last insemination (Soede *et al.*, 1995), which is in agreement with the interval used to identify the semen dose responsible for fertilization in this study. Thus, when the data were analyzed considering the semen dose most likely responsible for fertilization, the use of doses stored for 6–7 days did not affect the FR and TPB compared to the use of those stored for only one day. These data agree with a retrospective study that showed no reduction in TPB using doses stored for up to seven days in long-term extender (Anil *et al.*, 2004). However, different from the study previously cited, in the present trial the different ages of semen doses were controlled for each sow during all inseminations. We should consider that all the boars used in our trial were previously selected according to their capability of maintaining the motility of sperm cells up to eight days of storage. Additionally, only semen doses with motility above 70 % were used, since it is known that total motility below 60 % has a negative impact on reproductive performance (Flowers, 1997). The long-term storage capability of semen doses might improve production efficiency and simplify logistics due to a reduction in the frequency of semen dose deliveries to sow farms (Haugan *et al.*, 2007).

The reproductive performance was below that expected. This is probably due to the occurrence of vulvar discharge in the sows during the experiment, which is associated with a reduction in the conception rate and TPB (Dee, 1992). We do

not have an explanation for the occurrence of vulvar secretion, however, it was not associated with the treatments (AI1–3=11.5 % and AI5–7=9.7 %; $p=0,70$).

Conclusion

The use of semen doses preserved for up to seven days in long-term extender can be considered for a practical application without affecting the reproductive performance of sows.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, Ministério da Educação, Brazil), Bretanha, and Seara.

References

- Anil SS, Larriestra A, Deen J, Morrison RB, Minion L.** 2004. A retrospective study on the preserving capacity of a commercial boar semen extender. *Theriogenology*, 62(3-4):425-36. 10.1016/j.theriogenology.2003.10.019.
- Dee SA.** 1992. Porcine urogenital disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 8(3):641-60. 10.1016/S0749-0720(15)30709-X.
- Flowers W.** 1997. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil*, 52:67-78.
- Haugan T, Gaustad A, Reksen O, Gröhn Y, Hofmo P.** 2007. Fertility Results of Artificial Inseminations Performed with Liquid Boar Semen Stored in X-Cell™ vs BTS Extender. *Reprod Domest Anim*, 42(1):94-9. 10.1111/j.1439-0531.2006.00738.x.
- Knox RV.** 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1):83-93. 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.
- Pinart E, Yeste M, Prieto-Martínez N, Reixach J, Bonet S.** 2015. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter? *Theriogenology*, 83(9):1428-37. 10.1016/j.theriogenology.2015.01.007.
- Soede N, Wetzels C, Zondag W, De Koning M, Kemp B.** 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J Reprod Fertil*, 104(1):99-106. 10.1530/jrf.0.1040099.
- Waberski D, Weitze K, Lietmann C, Zur Lage W, Bortolozzo F, Willmen T, et al.** 1994. The initial fertilizing capacity of longerm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. *Theriogenology*, 41(7):1367-77. 10.1016/0093-691X(94)90188-O.

Yeste M. 2017. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Anim Reprod*, 14(1):69-81. 10.21451/1984-3143-AR895.

Table 1. Reproductive performance of sows inseminated with semen doses stored for different lengths of time (mean±SEM).

Variables	Semen storage time (days)		P-value
	1-3	5-7	
n	190	124	-
Weaning-to-estrus interval, d	3.8 ± 0.06	3.9 ± 0.07	0.37
Pregnancy rate, % (n/n)	85.8 (163/190)	85.5 (106/124)	0.94
Farrowing rate, % (n/n)	83.2 (158/190)	82.2 (102/124)	0.84
Total piglets born	14.2 ± 0.3	14.5 ± 0.3	0.38
Piglets born alive	13.0 ± 0.2	13.3 ± 0.3	0.57
Stillborns, %	6.4 ± 0.5	6.0 ± 0.7	0.49
Mummified, %	1.5 ± 0.3	2.3 ± 0.6	0.44

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização da IA a fertilidade do reprodutor recebeu grande importância econômica para a indústria suína. Atualmente, estima-se que o rebanho de reprodutores no Brasil seja de aproximadamente 10 mil animais os quais são responsáveis pela produção de doses de sêmen para aproximadamente 1,75 milhões de matrizes suínas. Apesar disso, existem dificuldades para identificar com maior acurácia a fertilidade destes reprodutores. Hoje estima-se que no rebanho de reprodutores exista de 7 a 15 % de animais que podem ser considerados subférteis (PATTERSON *et al.*, 2011; ROCA *et al.*, 2015). O macho subfértil caracteriza-se por apresentar valores de motilidade e morfologia dentro dos padrões (MT > 70% e > 80% de espermatozoides normais), porém apresentam redução de mais de 2% na taxa de parto e mais de 0,5 leitão por nascimento (Roca et al., 2016). Essa redução de desempenho pode ser em relação à média da granja ou a expectativa produtiva de cada linhagem genética. Logo, identificar com brevidade esses reprodutores, é imprescindível para se obter menores perdas reprodutivas a campo.

Uma possibilidade para determinar a fertilidade do reprodutor é através da avaliação da motilidade do sêmen diluído em diferentes tempos de armazenamento. Como a maioria das CPS possuem sistemas computadorizados, é relativamente fácil realizar tal avaliação. É de conhecimento que os reprodutores apresentam respostas individuais diferentes ao resfriamento a 17°C. Utilizando essa informação, realizamos a classificação dos reprodutores conforme a MP ao 5º dia de armazenamento. Na classificação destes reprodutores notamos que os machos da classe de alta preservação foram identificados mais facilmente, por possuírem uma menor variabilidade em relação a MP em diferentes ejaculados, o que na prática necessitaria de um menor número de coletas para a sua identificação. No entanto, nos reprodutores de baixa preservação houve uma maior dificuldade de classificação em função da maior variabilidade da MP em diferentes ejaculados. Apesar disso, a indústria poderia utilizar a classificação proposta como uma ferramenta para ranquear os machos, e assim, elaborar estratégias para o melhor aproveitamento de doses de sêmen dos reprodutores classificados como alta preservação.

Em nosso trabalho também avaliamos a resposta classe do reprodutor frente aos diferentes tipos de diluentes. Uma de nossas hipóteses era que diluentes de

longa ação poderiam prevenir o efeito negativo do tempo de armazenamento e da temperatura (17°C) sobre as células espermáticas dos machos classificados como baixa preservação. Contudo, mesmo utilizando diluentes mais complexos observamos que a classe de baixa preservação apresentava o mesmo padrão de MP que quando diluídos em diluentes de curta ação. Porém é interessante comentar que os reprodutores alta preservação apresentaram alta MP ao 10º dia de armazenamento mesmo em doses diluídas em diluentes de curta ação, demonstrando assim que o a classe do reprodutor apresenta uma importância maior que o diluente em si.

Ao empregar essa classificação em um teste *in vivo* utilizando uma única dose por fêmea com reduzido número de espermatozoides por dose ($1,5 \times 10^9$), foi possível observar que os reprodutores alta preservação apresentaram na média 0,9 leitão a mais que os reprodutores baixa preservação. Ao analisarmos esse dado através do index reprodutivo (taxa parto x total de leitões nascidos, para cada 100 fêmeas) observamos que houve uma redução em média de 71 leitões nos reprodutores baixa preservação. Normalmente a indústria suína preconiza utilizar doses com até 72 h de armazenamento nos protocolos de inseminação. Neste trabalho foi possível observar que ao utilizarmos uma única dose com 72 h para IA, a performance reprodutiva só foi afetada, quando essas doses eram provenientes de ejaculados de reprodutores de baixa preservação, independente do diluente utilizado. Isso reforça a ideia a classe do reprodutor tem um efeito maior sobre o desempenho reprodutivo do que o diluente, mesmo usando diluentes mais complexos.

As tecnologias aplicadas à análise de sêmen têm auxiliado para que possamos melhor entender a fisiologia espermática, destacando-se a análise proteômica, que visa a identificação das proteínas presentes na célula espermática e/ou no plasma seminal (BUSTAMANTE-FILHO *et al.*, 2019). Contudo, ainda é necessário entender melhor as associações existentes entre as proteínas seminais e os parâmetros espermáticos, e assim tornar possível a utilização de biomarcadores para seleção de machos com maior fertilidade. Em nosso trabalho identificamos 10 possíveis biomarcadores do plasma seminal associados com resistência ao armazenamento a 17°C e fertilidade. Entretanto mais estudos precisam ser elaborados para que tais biomarcadores possam ser validados e no futuro utilizados

em testes rápidos para a identificação de reprodutores que apresentem proteínas relacionadas com a fertilidade.

A identificação de machos com maior resistência ao resfriamento a 17°C (ou durabilidade) é importante no cenário atual de distribuição de doses através da genética líquida. Doses de machos com melhor capacidade de preservação poderiam ser utilizados por maior tempo o que facilitaria a logística de distribuição para as granjas. Isso foi observado em um dos trabalhos apresentados, onde doses de sêmen de até 8 dias foram utilizadas em condições de campo sem afetar o desempenho reprodutivo, aplicando somente critérios de classificação de machos pela capacidade de preservação sugeridas nesse estudo.

Dessa forma, com o presente trabalho pode se supor que a avaliação das doses ao longo do tempo de armazenamento pode ser usada para identificar a fertilidade dos reprodutores. Contudo, a classificação é melhor empregada para a identificação de reprodutores com maior resistência ao resfriamento. Além disso, foi possível observar diferenças nas características das proteínas do plasma seminal entre as classes de preservação o que no futuro poderia ajudar a selecionar reprodutores mais férteis.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. *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. DOI: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. e13, 2014. DOI:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
- BENNEMANN, P. E. *et al.* Artificial Insemination of Gilts with 1.5 Billion Sperms Stored in Different Periods Associated with Different Pre-ovulatory Intervals. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 40, n. 6, p. 507-510, 2005. DOI:10.1111/j.1439-0531.2005.00614.x
- BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 36, n. Supl 1, p. 5-16, 2008.
- BORCHARDT NETO, G.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Fatores relacionados com o diagnóstico de estro e momento da ovulação. *In: Suinocultura em Ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. 1º ed. Porto Alegre: Palloti, v. 2. cap. 9, p.107-125, 2005.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* Técnica, momento e frequência de realização da inseminação artificial em suínos. *In: Suinocultura em Ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. 1º ed. Porto Alegre: Palloti, v. 2. cap. 10, p.127-156, 2005a.
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* New artificial insemination technologies for swine. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. S2, p. 80-84, 2015. DOI:10.1111/rda.12544
- BORTOLOZZO, F. P. *et al.* Exame do ejaculado. *In: Suinocultura em Ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. 1º ed. Porto Alegre: Palloti, v. 2. cap. 7, p.69-89, 2005b.
- BROEKHUIJSE, M.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. Field data analysis of boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, n. Suppl 2, p. 59-63, 2011a. DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01861.x
- BROEKHUIJSE, M. *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. e1471, 2011b. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.05.040

BROEKHUIJSE, M. *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. DOI:10.2527/jas.2011-4311

BUSTAMANTE-FILHO, I. *et al.* Semen evaluation in the boar: use of proteomic analyses. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 43, n. 2, p. 184-195, 2019.

BUSTAMANTE-FILHO, I. C. *et al.* Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. **Animal Reproduction (AR)**. v. 11, n. 2, p. 96-103, 2014.

CAMPANERO-RHODES, M. A. *et al.* Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer: Effects of Zn²⁺ and acidic pH. **The FEBS journal**. v. 272, n. 21, p. 5663-5670, 2005. DOI:10.1111/j.1742-4658.2005.04974.x

CBRA, C. B. D. R. A. . *In: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, v. 3°. cap. 104, 2013.

DALLANORA, D. *et al.* Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 8, p. 815-819, 2004. DOI:10.1590/S0100-204X2004000800013

DE AMBROGI, M. *et al.* 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, n. 5, p. 543-552, 2006. DOI:10.1111/j.1365-2605.2006.00694.x

DE LAZARI, F. L. *et al.* Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17°C. **Theriogenology**. 2019. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.11.023

DUBÉ, C. *et al.* Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. **Theriogenology**. v. 62, n. 5, p. 874-886, 2004. DOI:10.1016/j.theriogenology.2003.12.006

DUFFY, B. *et al.* Glyph-based video visualization for semen analysis. **IEEE transactions on visualization and computer graphics**. v. 21, n. 8, p. 980-993, 2015. DOI:10.1109/TVCG.2013.265

DYCK, M. *et al.* Biological markers of boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, n. s2, p. 55-58, 2011. DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01837.x

DZIEKOŃSKA, A. *et al.* Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17° C. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 16, n. 3, p. 517-525, 2013. DOI:10.2478/pjvs-2013-0072

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

FEITSMA, H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n. Supl 1, p. s61-s71, 2009.

FERREIRA, C. *et al.* Contribution of boars to reproductive performance and paternity after homospermic and heterospermic artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 27, n. 7, p. 1012-1019, 2015. DOI:10.1071/RD13418

FERREIRA, F. M. *et al.* Processamento e armazenamento das doses inseminantes. **In: Suinocultura em Ação - Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. 1º ed. Porto Alegre: Palloti, v. 2. cap. 8, p.91-105, 2005.

FLOWERS, W. Triennial Reproduction Symposium: sperm characteristics that limit success of fertilization. **Journal of Animal Science**. v. 91, n. 7, p. 3022-3029, 2013. DOI:10.2527/jas2012-5945

FLOWERS, W.; DELLER, F.; STEWART, K. Use of heterospermic inseminations and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits and seminal plasma proteins in boar fertility. **Animal Reproduction Science**. v. 174, p. 123-131, 2016. DOI:10.1016/j.anireprosci.2016.09.016

FONTANA, D. L. **Inseminação artificial pós-cervical em tempo fixo em porcas recebendo pLH no início do estro**. 2013. 62f p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução). Orientador: I. Wentz. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FOXCROFT, G. *et al.* Identifying useable semen. **Theriogenology**. v. 70, n. 8, p. 1324-1336, 2008. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.07.015

FOXCROFT, G. R. *et al.* Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. **In: Proceedings of the 21st IPVS Congress, 2010, Vancouver, Canada**. Vancouver: Hein Jonker Media Management, 2010 July 18-21. p. 18-21

FRIES, H. C. C. *et al.* Inseminação artificial em momento fixo em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 38, n. (Supl 1), p. s83-s104, 2010.

GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**. v. 63, n. 2, p. 431-444, 2005. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.09.023

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in**

Domestic Animals. v. 39, n. 5, p. 303-308, 2004. DOI:10.1111/j.1439-0531.2004.00513.x

GERRITS, R. J. *et al.* Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology.** v. 63, n. 2, p. 283-299, 2005. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.09.013

GONZALEZ-CADAVID, V. *et al.* Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology.** v. 82, n. 5, p. 697-707, 2014. DOI:10.1016/j.theriogenology.2014.05.024

HUO, L.-J.; MA, X.-H.; YANG, Z.-M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology.** v. 58, n. 7, p. 1349-1360, 2002. DOI:10.1016/S0093-691X(02)00953-6

JOHNSON, L. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science.** v. 62, n. 1, p. 143-172, 2000. DOI: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, n. S2, p. 20-24, 2015. DOI: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. DOI:10.1111/j.1439-0531.1998.tb01334.x

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology.** v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012. DOI:10.2164/jandrol.110.012583

KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology.** v. 85, n. 1, p. 83-93, 2016. DOI:10.1016/j.theriogenology.2015.07.009

KNOX, R. V. *et al.* Effect of numbers of sperm and timing of a single, post-cervical insemination on the fertility of weaned sows treated with OvuGel®. **Theriogenology.** v. 92, p. 197-203, 2017. DOI:10.1016/j.theriogenology.2017.01.033

KOMMISRUUD, E. *et al.* Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. **Acta Veterinaria Scandinavica.** v. 43, n. 1, p. 49, 2002. DOI:10.1186/1751-0147-43-49

KUMMER, A. *et al.* Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 48, n. 5, p. 747-754, 2013. DOI:10.1111/rda.12155

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

LUCCA, M. S. **Avaliação da enzima paraoxonase tipo 1 no plasma seminal e sua expressão de RNAm dos tecidos das gônadas em suínos.** 2016. 60 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2016.

MAY, N. *et al.* Seminal plasma proteins associated with boar fertility. *In: International Conference on Boar Semen Preservation, VIIIth ed., 2015, Champaign. Proceedings* Champaign, Illinois, USA: Wiley Blackwell, 2015 Aug 9-12. p. 114

MCPHERSON, F.; NIELSEN, S.; CHENOWETH, P. Semen effects on insemination outcomes in sows. **Animal Reproduction Science.** v. 151, n. 1, p. 28-33, 2014. DOI:10.1016/j.anireprosci.2014.09.021

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science.** v. 105, n. 1, p. 104-118, 2008. DOI:10.1016/j.anireprosci.2007.11.016

NOVAK, S. *et al.* Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. **Journal of Andrology.** v. 31, n. 2, p. 188-200, 2010. DOI:10.2164/jandrol.109.007583

PATTERSON, J. *et al.* Increasing the genetic impact of elite boars. *In: Banff Pork Seminar - Advances in Pork Production, 2011, Edmonton, Canada.* Edmonton: University of Alberta, 2011 jan 18-21. p.

PÉREZ-PATIÑO, C. *et al.* Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. **Journal of proteomics.** v. 142, p. 15-23, 2016. DOI:10.1016/j.jprot.2016.04.026

PÉREZ-PATIÑO, C. *et al.* New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. **Journal of Proteome Research.** v. 17, n. 3, p. 1065-1076, 2018. DOI:10.1021/acs.jproteome.7b00728

PETRUNKINA, A. *et al.* Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. **Reproduction.** v. 121, n. 6, p. 889-896, 2001. DOI:10.1530/rep.0.1210889

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

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, n. 1-2, p. 97-113, 2004. DOI:10.1016/j.anireprosci.2003.08.007

REIS, G. R. *et al.* Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 30, n. 3, p. 159-166, 2002. DOI:10.22456/1679-9216.17225

ROCA, J. *et al.* Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, n. S2, p. 48-55, 2015. DOI:10.1111/rda.12530

ROCA, J. *et al.* Will AI in pigs become more efficient? **Theriogenology**. v. 86, n. 1, p. 187-193, 2016. DOI:10.1016/j.theriogenology.2015.11.026

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, n. 4, p. 312-318, 2003. DOI:10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 41, n. (Suppl.2), p. 2-10, 2006. DOI:10.1111/j.1439-0531.2006.00764.x

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. *et al.* Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 66, n. (Suppl. 1), p. 11-22, 2011. DOI:10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x

RUIZ-SANCHEZ, A. L. *et al.* The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**. v. 66, n. 4, p. 736-748, 2006. DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.12.012

SAACKE, R. *et al.* Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 663-677, 2000. DOI:10.1016/S0378-4320(00)00137-8

SCHULZE, M. *et al.* Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. **Animal Reproduction Science**. v. 140, n. 1, p. 70-76, 2013. DOI:10.1016/j.anireprosci.2013.05.012

SEVERO, C. K. *et al.* Cysteine addition on short-term cooled boar semen preservation and its relationship with swine field fertility. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. (Supl.1), p. 25-32, 2011. DOI:10.1590/S0100-736X2011001300005

SMITAL, J. Effects influencing boar semen. **Animal Reproduction Science**. v. 110, n. 3, p. 335-346, 2009. DOI:10.1016/j.anireprosci.2008.01.024

SOEDE, N.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs. **Animal Reproduction Science**. v. 124, n. 3, p. 251-258, 2011. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.02.025

SOEDE, N. *et al.* Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 104, n. 1, p. 99-106, 1995. DOI:10.1530/jrf.0.1040099

STRZEZEK, J. *et al.* Proteomics of boar seminal plasma—current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**. v. 5, n. 3, p. 279-290, 2005.

TEIXEIRA, S.; CHAVEIRO, A.; MOREIRA DA SILVA, F. The effects of three extenders on refrigerated boar semen. **South African Journal of Animal Science**. v. 45, n. 1, p. 82-88, 2015. DOI:10.4314/sajas.v45i1.10

ULGUIM, R. d. R. **Inseminação artificial em tempo fixo em leitoas e porcas desmamadas com o uso de hormônio luteinizante suíno através de diferentes vias de aplicação**. 2014. 72f p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2014.

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. DOI:10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x

WABERSKI, D.; HENNING, H.; PETRUNKINA, A. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, n. s2, p. 45-48, 2011. DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01836.x

WATERHOUSE, K. *et al.* Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**. v. 62, n. 9, p. 1638-1651, 2004. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.03.001

WILLIAMS, A. *et al.* Commercial application of reducing semen concentration per dose and single sire evaluation. *In*: Allen D. Lemman Swine Conference, 2011, Twin Cities, US. Twin Cities: University of Minnesota. p. 131-134

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, n. 2, p. 92-95, 2008.