

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**USO DE FOSFATIDILCOLINA COMO PROTETOR DE MEMBRANA ESPERMÁTICA
EM DOSES INSEMINANTES SUÍNAS ARMAZENADAS A 6°C**

Autor: Gabriela da Silva Oliveira

PORTO ALEGRE

2019/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**USO DE FOSFATIDILCOLINA COMO PROTETOR DE MEMBRANA ESPERMÁTICA
EM DOSES INSEMINANTES SUÍNAS ARMAZENADAS A 6°C**

Autor: Gabriela da Silva Oliveira

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientadora: Ana Paula Gonçalves Mellagi

Coorientadora: Monike Quirino

PORTO ALEGRE

2019/2

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Simone Rocha da Silva e Clei Eduardo da Silva Oliveira, por me criarem para o mundo, para que eu sempre buscasse os meus objetivos; por terem me criado para o bem, sempre mostrando a importância do que somos e não do que temos, e do amor. Além disso, agradeço imensamente por me mostrarem a importância do estudo e pelo incentivo para que eu passasse no curso que me fizesse feliz.

Agradeço ao meu maravilhoso, extraordinário e encantador irmão, Eduardo da Silva Oliveira por toda a cumplicidade e paciência. Eu te amo, meu.

Agradeço ao meu dindo, Elton Gamir da Silva Oliveira, por todo o acolhimento, suporte, cumplicidade e amizade, durante a vida toda, mas principalmente durante a graduação. Tu foste essencial para que eu conseguisse chegar até aqui e sei que sempre poderei contar contigo e tu poderá contar comigo. Estendo esse agradecimento à Tia Flávia e à Julia, que foram mãe e irmã, respectivamente, durante esses anos, vocês sempre estarão no meu coração.

Agradeço à pessoa mais especial que já conheci nesses 25 anos de vida, meu namorado, André Luis Mallmann. Eu não tenho palavras para expressar o quanto sou grata a ti. O nosso companheirismo e nossa cumplicidade enchem meu coração. Tua verdade, honestidade e dedicação me fazem não só ser apaixonada por ti, mas também me fazem torcer e ter um orgulho imenso de ti. Com certeza nossos caminhos seriam muito mais difíceis se não tivéssemos um na vida do outro. Muito obrigada, meu amor.

Agradeço à minha orientadora Professora Ana Paula Gonçalves Mellagi e à minha coorientadora Monike Quirino, por toda a ajuda, paciência, dedicação, horas extras e risadas compartilhadas ao longo do TCC e também ao longo desses anos que trabalhamos juntas.

Agradeço ao time TCC: Thaís Christ, Gabriela da Rosa, Gabriel Luft, Willian Valadares, sem vocês esses resultados não existiriam.

Ao Professor Fernando Pandolfo Bortolozzo, agradeço especialmente por toda a orientação durante esses cinco anos de Setor de Suínos, por toda a paciência, conselhos, puxões de orelhas, oportunidades de aprendizado e por acreditar no meu potencial. Aos demais Professores do Setor de Suínos: Ana Paula Gonçalves Mellagi, Rafael da Rosa Ulguim, Mari Lourdes Bernardi, Ivo

Wentz e David Barcellos, muito obrigada por todos os ensinamentos a mim repassados. Foi um prazer poder conviver com vocês.

Agradeço à Thaís Christ mais do que pela ajuda nas análises do TCC, mas por eu ter ganhado uma amiga para o resto da vida.

Aos meus colegas de estágio no Setor de Suínos, por toda a parceria desses anos e por todos os ensinamentos trocados. Principalmente a Mariáh, Joana, Elisa, Dani, Deivison, Vic, Gabi Rosa e Angela.

Ao pessoal da pós-graduação, por terem proporcionado a oportunidade de ajudarmos em experimentos e por transmitir muito conhecimento para todos nós. Em especial à Mariana Menegat, Tila Menezes, Aline Paschoal, André Luis Mallmann, pelas oportunidades.

Agradeço à minha fiel companheira nesses anos de faculdade, Juliana Krebs, por todas as risadas, caronas, e pelos momentos vividos juntas. Tu és sensacional, Ju. Aos meus colegas e amigos Karina, Leo, Thiago, Giulia, Bianca, Elisar, Gabi Velho e Dominique, vocês com certeza faziam valer a pena ir pra faculdade, obrigada por todos os mates e conversas compartilhados.

À UFRGS pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro nesses cinco anos como bolsista de iniciação científica.

Gabriela da Silva Oliveira

USO DE FOSFATIDILCOLINA COMO PROTETOR DE MEMBRANA ESPERMÁTICA EM
DOSES INSEMINANTES SUÍNAS ARMAZENADAS A 6°C.

Aprovado em 11 de dezembro de 2019

APROVADO POR:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Gonçalves Mellagi
Orientadora

Med. Vet. Msc. Monike Quirino
Coorientadora

Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim
Membro da Banca

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Banca

RESUMO

A temperatura de armazenamento pode afetar a motilidade e viabilidade espermática. Baixas temperaturas de armazenamento podem ser uma alternativa ao uso de antimicrobianos; contudo, são críticas para o espermatozoide suíno devido às propriedades de sua membrana plasmática. Nesse contexto, algumas substâncias com propriedades de proteção de membrana têm sido estudadas para viabilizar o armazenamento de doses inseminantes suínas em baixas temperaturas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de fosfatidilcolina como protetor de membrana espermática em doses inseminantes suínas armazenadas a 6°C. Dezesesseis ejaculados foram diluídos em *Beltsville Thawing Solution* (BTS) e distribuídos em seis tratamentos. As doses inseminantes foram armazenadas por 120 h em duas temperaturas diferentes (17 e 6°C) e três taxas de fosfatidilcolina foram aplicadas a elas (0, 0,5 e 2,0%; fosfatidilcolina:espermatozoide) em um fatorial 2 × 3. As doses foram avaliadas nas 24, 72 e 120 h de armazenamento. A fosfatidilcolina não afetou a motilidade total e progressiva ao longo do armazenamento ($P \geq 0,064$). Doses armazenadas a 17°C apresentaram maior motilidade total do que doses armazenadas a 6°C (86,6% e 73,3%, respectivamente; $P < 0,0001$). A motilidade progressiva também foi maior para doses a 17°C do que doses a 6°C (81,1% e 64,4%, respectivamente; $P < 0,0001$). Doses com 0% apresentaram menor pH do que doses com 2,0% de fosfatidilcolina (7,2 e 7,3, respectivamente; $P < 0,05$); no entanto, nenhuma diferença foi observada com 0,5% ($P = 0,285$). Aos 300 min de incubação a 38°C, não houve diferença para a motilidade progressiva entre as taxas de fosfatidilcolina em doses armazenadas a 6°C ($P \geq 0,952$). Já para doses armazenadas a 17°C, aos 300 min de incubação foram observadas em doses com 2,0% de fosfatidilcolina maior motilidade total (76,7% e 57,8%; $P = 0,0026$) e progressiva (69,1% e 49,0%; $P = 0,0017$) do que em doses com 0%, respectivamente. Doses com 2,0 e 0,5% de fosfatidilcolina apresentaram maior porcentagem de integridade de membrana do que doses com 0% (80,2%, 78,7% e 74,8%, respectivamente; $P < 0,0001$). A integridade de acrossoma foi maior em doses com 2,0% de fosfatidilcolina (95,23%, 96,41% e 97,62%; 0, 0,5 e 2,0% PC, respectivamente; $P = 0,003$). Doses armazenadas a 6°C apresentaram menor integridade de membrana (69,2 e 84,8%) e acrossoma (95,6 e 97,3%) do que doses armazenadas a 17°C ($P < 0,0001$). Esses resultados sugerem que a fosfatidilcolina mostra-se promissora para o uso como protetor de membrana em doses

inseminantes suínas armazenadas em baixas temperaturas. Além disso, a fosfatidilcolina foi eficaz em manter a motilidade espermática durante longa incubação a 38°C.

Palavras-chave: fosfatidilcolina; sêmen suíno; baixa temperatura, protetor de membrana.

ABSTRACT

Storage temperature impairs boar semen motility and viability. Low temperature may be an alternative to antimicrobial use; however, low temperature is critical for boar spermatozoa due to membrane properties. In this context, some membrane protective substances have been studied to allow low temperature storage. The aim of the present study was to evaluate the phosphatidylcholine (PC) as a membrane protector on boar semen doses stored at 6°C. Sixteen normospermic ejaculates were diluted with Beltsville Thawing Solution (BTS) and assigned to six treatments. Semen doses were stored for 120 h at two different temperatures (17 and 6 °C) and three PC rates were applied to them (0, 0.5 and 2.0 %; PC:spermatozoa) in a 2 × 3 factorial arrangement. Semen doses were analyzed at 24, 72 and 120 h of storage. Phosphatidylcholine did not impair total and progressive motility during the storage time ($P \geq 0.064$). Doses stored at 17°C showed higher total motility than doses stored at 6°C (86.6% and 73.3%, respectively; $P < 0.0001$). Progressive motility was also higher for doses at 17 than 6°C (81.1% and 64.4%, respectively; $P < 0.0001$). Doses with 0% had lower pH values than doses with 2.0% PC (7.2 and 7.3, respectively; $P < 0.05$), but no difference was observed with 0.5% ($P = 0.285$). At 300 min of incubation at 38°C there was no significant difference of total and progressive motility among PC rates for doses stored at 6°C ($P \geq 0.952$). However, for doses stored at 17°C, at 300 min of incubation higher total (76.7% and 57.8%; $P = 0.0026$) and progressive (69.1% and 49.0%; $P = 0.0017$) motilities were observed in doses with 2.0% PC than doses with 0%, respectively. Doses with 2.0 and 0.5% had higher percentages of spermatozoa with intact plasma membrane than doses with 0% (80.2%, 78.7% and 74.8%, respectively; $P < 0.0001$). Acrosome integrity was higher for doses with 2.0% PC (95.23%, 96.41% and 97.62%; 0, 0.5 and 2.0% PC, respectively; $P = 0.003$). Doses stored at 6°C showed lower membrane (69.2 and 84.8%) and acrosome integrity (95.6 and 97.3%) than doses stored at 17°C ($P < 0.0001$). These results suggest that PC could be used as a membrane protector for boar spermatozoa at low storage temperatures. Furthermore, PC seems to hold sperm motility during long incubation at 38°C.

Keywords: *phosphatidylcholine, boar semen, low temperature, membrane protector*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de diluentes comerciais para preservação líquida de sêmen (não são apresentadas as quantidades de antimicrobianos).	22
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Cooling curve of doses stored at 17°C and 6°C.....	41
Figure 2 - Total motility according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).	42
Figure 3 -Progressive motility according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).....	42
Figure 4 - Kinematic traits according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).	43
Figure 5 – pH according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).	44
Figure 6 - Total Motility of TRT according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).....	45
Figure 7 - Total Motility of TRT according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).....	45
Figure 8 - Membrane integrity according to PC rates at 72 hours of storage at both temperatures (6 and 17°C).	46
Figure 9 - Acrosome integrity according to PC rates at 72 hours of storage at both temperatures (6 and 17°C).....	46

LISTA DE ABREVIACÕES

ALH – Amplitude of lateral head displacement

BCF – Beat-cross frequency

BHT – Butilato de hidroxitolueno

BSA – Albumina sérica bovina

BTS – Beltsville thawing solution

CASA – Computer assisted semen analysis

ECP – Energy charge potential

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécie reativa de oxigênio

LIN – Linearity

PC – Phosphatidylcholine

STR – Straightness

TRT – Thermo-resistance Test

TTR – Teste de termo resistência

VAP – Average path velocity

VCL – Curvilinear velocity

VSL – Straight-line velocity

WOB – Wobble

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Metabolismo energético e composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide suíno.....	15
2.1.1. Metabolismo energético do espermatozoide suíno.....	15
2.1.2. Composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide suíno.....	16
2.2. Influência do armazenamento sobre a qualidade da dose inseminante de suínos	18
2.2.1. Tempo de armazenamento	18
2.2.2. Temperatura de armazenamento.....	19
2.3. Constituintes protetores nos diluente de sêmen suíno	21
2.3.1. Fosfatidilcolina como protetor de membrana espermática.....	23
3. ARTIGO CIENTÍFICO	25
4. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

O sêmen suíno é sensível a baixas temperaturas e, por isso é armazenado em temperaturas mais altas, em torno de 15-18°C (JOHNSON *et al.*, 2000). Essa sensibilidade do espermatozoide suíno ao frio parece estar relacionada com a composição lipídica da membrana plasmática, a qual é composta por diferentes fosfolipídios e ácidos graxos, acarretando a separação de fases da membrana plasmática quando o espermatozoide é submetido a temperaturas próximas a 5°C (PARKES; LYNCH, 1992; YESTE, 2016). Outro fator que contribui para essa sensibilidade ao frio é a distribuição assimétrica de colesterol ao longo da membrana plasmática (JOHNSON *et al.*, 2000). Contudo, apesar do efeito deletério das baixas temperaturas sobre o espermatozoide suíno, é necessário salientar que o armazenamento hipotérmico propicia uma redução da carga microbiana nas doses suínas (MENEZES, 2018; WABERSKI *et al.*, 2019a), o que contribui para a diminuição da utilização de antimicrobianos na cadeia produtiva de suínos.

Alguns estudos recentes evidenciam que doses inseminantes suínas podem ser armazenadas a 5°C quando diluentes altamente protetores de membrana são utilizados (MENEZES, 2018; WABERSKI *et al.*, 2019a). No entanto, WABERSKI *et al.* (2019a) observaram que doses inseminantes de suínos diluídas com *Beltsville Thawing Solution* (BTS, diluente de curta duração) e armazenadas a 5 não conseguiram manter a motilidade maior que 70% durante o armazenamento, e que doses armazenadas a 5°C diluídas com Androstar Premium (diluente de longa duração) não diferiram na porcentagem de células viáveis de doses armazenadas a 17°C com BTS ou Androstar Premium. Esses resultados evidenciam a importância da utilização de substâncias protetoras de membrana, quando os espermatozoides suínos são submetidos ao choque térmico ou à baixas temperaturas. Atualmente, as composições dos diluentes não são disponíveis para consulta, portanto não se sabe quais substâncias estão efetivamente sendo utilizadas.

Deste modo, alguns autores têm estudado diversas substâncias que possuem ações protetivas ao espermatozoide suíno, e nesse contexto pode-se citar a fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina é o fosfolipídio mais abundante e possui a capacidade de incorporação à membrana plasmática do espermatozoide suíno (PARKES; LYNCH, 1992; KASIMANICKAM & BUHR, 2016). ALVAREZ-RODRIGUEZ, VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ (2017) e PEARODWONG *et al.* (2019) avaliaram a substituição da gema do ovo por diferentes tipos e concentrações de fosfatidilcolina na criopreservação de sêmen suíno. Em ambos os estudos a

fosfatidilcolina não se mostrou eficaz na manutenção da viabilidade espermática. Contudo, a criopreservação é mais desafiadora para a células espermáticas do que o armazenamento ao redor dos 5°C. Neste sentido, LONG; CONN (2012) avaliaram sêmen de peru diluído com uma solução de fosfatidilcolina em diferentes concentrações e armazenado a 4°C. Os autores observaram que, 0,5 ou 2,5 mg/mL de fosfatidilcolina melhoraram a fertilidade do sêmen de peru após 24 h de armazenamento. Esse resultado pode indicar uma capacidade de proteção de acrossoma por parte da fosfatidilcolina. No entanto, poucos estudos utilizando esse fosfolípido em doses de sêmen suíno refrigeradas estão disponíveis. Nesse contexto, a fosfatidilcolina poderia se caracterizar como um protetor de membrana plasmática do espermatozoide suíno em doses inseminantes armazenadas a baixas temperaturas (abaixo de 10°C). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os parâmetros espermáticos de doses inseminantes suínas adicionadas de duas quantidades de fosfatidilcolina, quando armazenadas a 6°C em diluente de curta ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metabolismo energético e composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide suíno

2.1.1. Metabolismo energético do espermatozoide suíno

O espermatozoide é uma célula que interage com o meio extracelular e, por isso, é alterado pelo meio que o circunda e, nesse contexto, sua membrana plasmática atua como um mecanismo de comunicação bidirecional (LEAHY; GADELLA, 2011). No entanto, o espermatozoide possui características muito distintas de uma célula somática, e caracteriza-se por ser uma célula extremamente especializada. Apesar de tamanha especialização para a fecundação, o espermatozoide perde grande parte do citosol e uma gama de organelas ao final de sua maturação. Organelas como o complexo de Golgi, retículo endoplasmático, os lisossomos, peroxissomos e ribossomos são perdidas, pois não são necessárias para a manutenção da célula espermática ou para a fertilização do oócito. Deste modo, o espermatozoide não é capaz de sintetizar proteínas *de novo*, nem realizar a reciclagem de proteínas superficiais (GADELLA; LUNA, 2014).

Para que ocorra a fecundação, um dos principais fatores limitantes é a motilidade do espermatozoide, fazendo com que a regulação do metabolismo energético da célula espermática seja fundamental para que a célula fique móvel durante o intervalo cobertura-ovulação (RODRIGUES-GIL; BONET, 2015). A manutenção da energia espermática é baseada na obtenção de energia de fontes externas ou na utilização de reservas internas. O principal mecanismo para a utilização de fontes externas de energia é a utilização de monossacarídeos pela via glicolítica e a subsequente metabolização dos produtos dessa reação pela fosforilação oxidativa na mitocôndria. Já a utilização das reservas energéticas do espermatozoide consiste na quebra de glicogênio em glicose, para posterior utilização na via glicolítica (RODRIGUES-GIL; BONET, 2015).

A dependência do espermatozoide da via glicolítica, contudo, não visa somente a produção de ATP, mas também a produção de lactato que é a principal fonte da acetil-Coa mitocondrial (JONES; BUBB, 2000). A oxidação via mitocôndria é de suma importância para a obtenção de energia pelo espermatozoide; no entanto, corresponde a uma via secundária quando comparada à glicólise.

Além desses principais mecanismos de obtenção de energia, existem outras fontes energéticas que o espermatozoide suíno pode utilizar, como di ou triglicerídeos e o fosfolipídios de membrana. Em estudo realizado por JONES; BUBB (2000), foram avaliados espermatozoides suínos coletados do epidídimo e incubados a 34°C em PBS por um período de 10 h sem fontes exógenas de energia. Os autores observaram que quando se adicionou ao meio uma substância que impede a fase 2 da glicólise (*(R,S)-a-bromohydrin phosphate*), as concentrações de glicerol 3-fosfato no meio aumentaram cerca de três vezes após 4 h de incubação, o que sugere a ocorrência de um bloqueio da via glicolítica e, também, uma redução nas concentrações de glicerol, indicando a sua metabolização pela célula através da gliconeogênese.

No mesmo estudo, os autores constataram que as concentrações de triglicerídeos diminuíram de 40–69 nmol/mg de proteína para 8–17 nmol/mg de proteína após 5 h de incubação. Também foi observado que os principais ácidos graxos na hora zero foram o C16:0, C18:0 e o C18:1 e após 5 h de incubação as concentrações quase dobraram e, além dos demais ácidos graxos, o C20:1 foi identificado. Assim, é possível que os di ou triglicerídeos contenham alguns ácidos graxos de cadeia curta que são metabolizados após a liberação, deixando os ácidos graxos de cadeia longa (JONES; BUBB, 2000). Deste modo, quando em condições adversas, os fosfolipídios configuram uma fonte energética para os espermatozoides através da sua quebra e produção de glicerol 3-fosfato e glicerol.

2.1.2. Composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide suíno

A sensibilidade do espermatozoide suíno ao frio parece estar relacionada com a composição fosfolipídica da membrana plasmática. O fosfolipídio mais abundante é a fosfatidilcolina, seguido da fosfatidiletanolamina. A membrana plasmática do espermatozoide também é composta por ácidos graxos, sendo os mais abundantes o ácido docosapentaenoico (22:5), palmítico (16:0), esteárico (18:0) e o ácido docosaexanoico (22:6) (PARKES; LYNCH, 1992). Conforme a temperatura diminui, os fosfolipídios apresentam maior restrição no movimento lateral ao longo da membrana plasmática, o qual é dependente da temperatura de mudança de fase (fase fluida e fase gel) dos ácidos graxos das cadeias laterais dos fosfolipídios (WATSON, 1996).

A transição entre fases ocorre de maneira gradual de acordo com a variação de temperatura, e cada ácido graxo muda de fase em uma determinada temperatura. Assim, devido à diversidade

na composição lipídica da membrana, pode ocorrer a separação de fases e conseqüentemente dano a célula espermática (YESTE, 2016). A fluidez da membrana aumenta conforme ocorre o aumento da temperatura. Contudo, na faixa de temperatura que varia de 10-30°C, ocorre uma descontinuidade desse efeito linear entre temperatura e fluidez de membrana, o que indica a transição de fases e uma reestruturação da membrana plasmática do espermatozoide suíno (SCHMID *et al.*, 2013). No entanto, Yeste (2016) afirma que essa mudança de fase da membrana plasmática do espermatozoide só ocorre quando a temperatura se aproxima de 5°C.

O colesterol é o principal esteroide e um componente majoritário da membrana plasmática dos espermatozoides de diferentes espécies, sendo capaz de influenciar o comportamento dos lipídios, ampliando a transição entre fases e, assim, prevenindo mudanças bruscas na membrana e minimizando a separação das fases (PARKES; LYNCH, 1992; WATSON, 1996). O suíno é a espécie que apresenta a menor proporção colesterol:fosfolipídios quando comparado com espécies mais resistentes ao resfriamento, como bovinos e equinos (WATSON, 1996). Além disso, o colesterol se apresenta de maneira assimétrica ao longo da membrana do espermatozoide suíno (JOHNSON *et al.*, 2000). Essas características de composição e distribuição do colesterol conferem maior sensibilidade do espermatozoide suíno à baixas temperaturas.

Como a composição lipídica do espermatozoide suíno apresenta um alto nível de ácidos graxos insaturados, a peroxidação lipídica pode ser um dos fatores responsáveis pelo dano às células espermáticas ao longo do armazenamento (CEROLINI *et al.*, 2000). A peroxidação lipídica ocorre através da reação das espécies reativas ao oxigênio (ERO), com as ligações duplas dos ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios de membrana. Produzidas em pequenas quantidades, as ERO são funcionalmente importantes para funções associadas à capacitação espermática. No entanto, quando a produção de ERO excede as defesas antioxidantes do espermatozoide, um estado de estresse oxidativo é induzido, resultando em dano oxidativo à membrana plasmática do espermatozoide e na quebra da fita de DNA no núcleo (GUTHRIE; WELCH, 2012). Em estudo realizado por CEROLINI *et al.* (2000), os autores observaram que doses inseminantes armazenadas a 19°C sem protetor antioxidante apresentaram uma redução na porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados ao longo do armazenamento e um aumento proporcional na porcentagem de ácidos graxos saturados.

Desta maneira, o espermatozoide suíno caracteriza-se por ser sensível não só às mudanças de temperatura, mas também à peroxidação lipídica, em decorrência da composição lipídica de sua membrana plasmática.

2.2. Influência do armazenamento sobre a qualidade da dose inseminante de suínos

2.2.1. Tempo de armazenamento

As mudanças funcionais e estruturais do espermatozoide durante o armazenamento na forma líquida parecem estar relacionadas a um envelhecimento natural das células espermáticas que pode ser influenciado pelas condições e tempo de armazenamento (JOHNSON *et al.*, 2000). HOU; MA; YANG (2002) avaliaram a integridade espermática de doses inseminantes armazenadas a 17°C ao longo de 15 dias em diferentes diluentes (BTS, KIEV, Zorlesco e Androhep). A viabilidade espermática analisada com SYBR-14/PI diminuiu ao longo do tempo de armazenamento independentemente do diluente utilizado. No entanto, aos três dias de armazenamento, essa queda foi menos pronunciada nos diluentes Androhep (97,8% para 88,2%) e Zorlesco (97,8% para 88,9%), quando comparada com BTS (97,1% para 85,8%) e KIEV (97,1% para 78,4%). O decréscimo da atividade mitocondrial também foi observado ao longo do armazenamento; no entanto, ao 5º dia de armazenamento, a porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial foi superior a 80% para todos os diluentes. A integridade de acrossoma foi superior a 80% no dia 7 e superior a 70% no dia 11 de armazenamento para todos os diluentes, no entanto o KIEV apresentou menor desempenho quando comparado aos demais diluentes em ambos os momentos.

PAULENZ; KOMMISRUDE; HOFMO (2000) avaliaram doses inseminantes suínas diluídas com BTS e armazenadas durante 96 h a 15°C. Houve uma redução significativa na motilidade da hora zero (77,8%) para as 96 h (50,9%), e o mesmo comportamento também foi observado para a integridade de acrossoma (95,8% e 81,5%). No entanto, além do impacto sobre a motilidade, o tempo de armazenamento também pode afetar outras funções do espermatozoide. Nesse sentido, WABERSKI *et al.* (1994) observaram que doses inseminantes diluídas com BTS ou Androhep tiveram não só uma redução da motilidade a partir de 48 h de armazenamento, mas também uma redução no percentual de células com acrossoma íntegro a partir das 72 h de armazenamento. Além disso, os autores observaram que a taxa de prenhez foi menor quando as fêmeas foram inseminadas

com doses armazenadas por 96 ou mais horas, e que a taxa de fertilidade já apresentou diminuição quando utilizadas doses armazenadas por 24 ou mais horas. No entanto, uma diminuição mais acentuada foi observada a partir de 72 e 96 h de armazenamento.

A peroxidação lipídica é outro fator deletério às células espermáticas ao longo do armazenamento. No estudo de CEROLINI *et al.* (2000) foi observado que doses inseminantes elaboradas com BTS e armazenadas por cinco dias apresentaram uma diminuição no percentual de células viáveis a partir do terceiro dia de armazenamento; enquanto que doses inseminantes elaboradas com BTS e com adição de α -tocoferol, um antioxidante, conseguiram manter a viabilidade celular ao longo dos cinco dias de armazenamento. Além disso, foi observado que nas doses tratadas com α -tocoferol, houve uma incorporação da substância nos espermatozoides; enquanto que nas doses controle houve um aumento das substâncias reativas ao ácido barbitúrico, indicativo de peroxidação lipídica. Deste modo, a susceptibilidade à peroxidação lipídica diminuiu 61 e 77% nos dias 3 e 5 de armazenamento, respectivamente, com a adição de α -tocoferol.

2.2.2. Temperatura de armazenamento

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a funcionalidade do espermatozoide após a ejaculação e durante o armazenamento das doses inseminantes. Esse efeito é consequência da sensibilidade do espermatozoide suíno ao choque térmico, pois conforme a temperatura diminui, há uma redução no número de espermatozoides com membrana íntegra e capazes de manter sua ultraestrutura e seus componentes bioquímicos. Por esse motivo, o sêmen suíno é armazenado em temperaturas mais altas, em torno de 15-18°C, evitando-se quedas bruscas de temperatura desde o processamento até o armazenamento (JOHNSON *et al.*, 2000).

Segundo MENEZES (2018), a motilidade das doses armazenadas a 5°C diluídas com Androstar Premium foi menor quando comparada às doses armazenadas a 17°C ($P < 0,05$). Além disso, as doses mantidas a 5°C apresentaram uma queda na motilidade nas 72 h de armazenamento ($P < 0,05$), enquanto que as doses mantidas a 17°C apresentaram essa diminuição apenas nas 120 horas de armazenamento ($P < 0,05$). No entanto, após 300 minutos de incubação a 38°C, as doses armazenadas a 5°C apresentaram motilidade superior àquelas armazenadas a 17°C. Além disso, em trabalho realizado por WABERSKI *et al.* (2019a), doses armazenadas a 5°C e diluídas com BTS apresentaram motilidade menor ao longo de 144 horas de armazenamento, quando comparadas

com doses armazenadas a 5°C e diluídas com Androstar Premium e, também, com doses armazenadas a 17°C com ambos os diluentes ($P < 0,05$). Cabe salientar que, em ambos os experimentos, as doses diluídas com Androstar Premium e armazenadas a 5°C apresentaram motilidade superior a 70%, a qual seria o limite de motilidade aceitável para realização da inseminação artificial. Além disso, no trabalho de WABERSKI *et al.* (2019a) não houve diferença significativa para a variável integridade de membrana dos espermatozoides nas doses armazenadas a 5°C e diluídas com Androstar Premium (89,2,%) e doses armazenadas a 17°C com ambos os diluentes (BTS: 90,3,% e Androstar Premium: 92,1,%; $P > 0,05$). No entanto, as doses armazenadas a 5°C e diluídas com BTS apresentaram menor percentual de células íntegras quando comparadas com os demais tratamentos (82,8%; $P < 0,05$).

No contexto de proteção de membrana espermática, JAKOP *et al.* (2019) observaram que doses contendo ácido palmitoleico (C16:1) e armazenadas a 6°C apresentaram maior viabilidade espermática e maior percentual de atividade mitocondrial quando comparadas a outros ácidos graxos e com doses sem aditivos, sugerindo que essa substância tem um poder antioxidante, mesmo sendo um substrato para a peroxidação lipídica, devido à sua ligação dupla. Esses resultados evidenciam que quando há a utilização de protetores de membrana, o efeito deletério das baixas temperaturas pode ser amenizado e bons parâmetros espermáticos podem ser observados.

Apesar do efeito negativo de baixas temperaturas sobre o espermatozoide, a diminuição da temperatura de armazenamento reduz o metabolismo celular e permite o armazenamento a longo prazo de células germinativas, embriões e tecidos (YESTE, 2016). Além disso, a utilização de baixas temperaturas de armazenamento pode reduzir a contaminação bacteriana das doses inseminantes, inclusive de doses sem antimicrobianos (MENEZES, 2018). Corroborando com esses resultados, WABERSKI *et al.* (2019a) constataram que doses inseminantes suínas armazenadas a 5°C, sem antimicrobiano, mantiveram o crescimento bacteriano constante ou tiveram uma diminuição de 2 a 20 vezes na contagem de UFC/mL, enquanto que nas doses armazenadas a 17°C houve um aumento da população bacteriana, mesmo com antimicrobiano. A presença de bactérias no sêmen é um achado comum no sêmen *in natura* ou diluído e pode ter efeitos deletérios sobre a qualidade e longevidade do sêmen (ALTHOUSE; LU, 2005). MENEZES (2018) observou que doses inseminantes com mais de 1000 UFC/mL apresentam redução da motilidade total e progressiva nas 120 horas de armazenamento ($P < 0,05$).

2.3. Constituintes protetores nos diluente de sêmen suíno

A inseminação artificial é a biotecnologia mais aplicada na reprodução de suínos mundialmente, e o sêmen líquido continua sendo a principal forma de preservação (WABERSKI *et al.*, 2019b). Segundo JOHNSON *et al.* (2000), posteriormente à temperatura, o meio de diluição é o maior fator que afeta a funcionalidade da célula espermática após a coleta e durante o armazenamento do sêmen. E, segundo esse mesmo autor, os fatores básicos de um diluente são capacidade tamponante, e a pressão osmótica do meio.

O diluente tem por finalidade permitir a viabilidade da célula espermática até o momento da inseminação artificial e para isso são adicionadas substâncias que apresentam diferentes funcionalidades. Na Tabela 1, é possível visualizar a formulação de alguns diluentes. Dentre as substâncias presentes no diluente, a glicose tem lugar de destaque por atuar como principal fonte de energia para a célula. Além disso, a presença de tampões é necessária para a manutenção do pH do meio (FERREIRA *et al.*, 2005). Os tampões mais utilizados são o bicarbonato de sódio, citrato de sódio (JOHNSON *et al.*, 2000). O tampão bicarbonato possui pouca capacidade tamponante, não prevenindo oscilações bruscas de pH; enquanto que o HEPES suporta maiores flutuações de pH. Além disso, alguns antimicrobianos podem ser adicionados aos diluente a fim de evitar ou reduzir o crescimento bacteriano ao longo do armazenamento (FERREIRA *et al.*, 2005).

A variabilidade da composição química dos diluentes confere a eles propriedades diferentes. Em função dessas características, atualmente os diluentes são comumente classificados como de longa ou curta ação. Os diluentes de longa ação permitem maior flexibilidade na utilização de doses inseminantes e maior proteção para transportes de longas distâncias. Doses inseminantes diluídas com diluentes de curta ação são utilizadas em até quatro dias; enquanto que doses diluídas com diluentes de longa ação são utilizadas em até sete dias de armazenamento (WABERSKI *et al.*, 2019b). Essa diferença entre diluente de curta e longa ação está relacionada com a presença de substâncias estabilizantes de membrana. Alguns exemplos de estabilizantes são a albumina sérica bovina (BSA), butilato de hidroxitolueno (BHT) e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que atua como quelante de cálcio, prevenindo mudanças semelhantes à capacitação espermática (FERREIRA *et al.*, 2005). No passado, as fórmulas dos diluentes eram reveladas e, portanto, eram evidentes quais substâncias eram utilizadas, bem como as suas quantidades. No entanto, as fórmulas dos diluentes comercializados atualmente são confidenciais, o que dificulta o

conhecimento das substâncias utilizadas (GADEA, 2003). No cenário atual, cada empresa desenvolve seus próprios protetores de membrana, os quais são usados em conjunto com antioxidantes, em suas formulações. O Androstar[®] Premium (Minitub GmbH, Tiefenbach, Alemanha), por exemplo, é um diluente de longa duração que não contém BSA, mas moléculas inovadoras chamadas de ingrediente protetor de membrana (MENEZES, 2018). Além disso, alguns autores têm estudado novas substâncias protetoras de membrana como o α -tocoferol, ácidos graxos, e também a fosfatidilcolina (CEROLINI *et al.*, 2000; ALVAREZ-RODRIGUEZ, VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2017; JAKOP *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Composição de diluentes comerciais para preservação líquida de sêmen (não são apresentadas as quantidades de antimicrobianos).

Ingrediente (g/L)	Diluentes						
	BTS ¹	KIEV	IVT	ZORLESCO	ANDROHEP	ANDROSTAR PLUS	BTS ²
Glicose	37	60	3	11,5	26	79,36	76,06
EDTA	1,25	3,7	24,3	2,3	2,4	3,05	2,65
Citrato de sódio	6	3,7	2,4	11,7	8	12,38	15,89
Bicarbonato de sódio	1,25	1,2	0,4	1,25	1,2	2,66	3,31
Cloreto de potássio	0,75	-	-	-	-	1,6	1,59
TRIS	-	-	-	6,5	-	-	-
HEPES	-	-	-	-	9,0	-	-
Ácido Cítrico	-	-	-	4,1	-	-	-
Cisteína	-	-	0,05	0,1	-	0,42	-
BSA	-	-	-	5	2,5	-	-

Fonte: adaptado de JOHNSON *et al.*, (2000) e MENEGAT (2016).

1 e 2 sobrescritos indicam a fonte da composição citada, PURSEL; JOHNSON (1975) e MINITUBE, respectivamente BSA: albumina sérica bovina; EDTA: o ácido etilenodiamino tetra-acético; TRIS: Tris-(hidroximetil)-aminometano; HEPES: ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico.

2.3.1. Fosfatidilcolina como protetor de membrana espermática

Considerando que o ao longo do armazenamento o espermatozoide suíno fica exposto à danos de membrana e acrossoma (WABERSKI *et al.*, 1994), peroxidação lipídica (CEROLINI *et al.*, 2000), à ação de metabólitos e íons do meio, e, quando armazenado em baixas temperaturas, há uma reorganização da membrana plasmática acentuando esses danos (JOHNSON *et al.*, 2000), alguns autores avaliaram o uso de fosfatidilcolina como protetor de membrana sob condições de criopreservação na espécie suína (ALVAREZ-RODRIGUEZ, VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2017; PEARODWONG *et al.*, 2019), e refrigeração em perus (LONG; CONN, 2012).

Recentemente, ALVAREZ-RODRIGUEZ, VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ (2017) avaliaram se a substituição da gema de ovo por fosfatidilcolina derivada do ovo ou da soja poderia melhorar os efeitos oxidativos oriundos da criopreservação nos espermatozoides da fração rica ou da cauda do epidídimo de machos suínos. Dois tipos diferentes de fosfolipídios foram testados: (I) natural: fosfatidilcolina de gema de ovo e de lecitina de soja; e (II) sintético: fosfatidil-glicerol. Em geral, os fosfolipídios testados não foram capazes de manter a motilidade espermática nem a viabilidade pós-descongelamento, devido ao aumento da produção de ERO e peroxidação lipídica.

Corroborando com esses resultados, PEARODWONG *et al.* (2019) avaliaram o efeito da substituição da gema de ovo por lecitina (fosfatidilcolina extraída da soja) sobre as características do espermatozoide suíno criopreservado. Quinze ejaculados foram diluídos em três diluentes diferentes. O diluente I era um diluente comercial de sêmen suíno. O diluente II foi classificado em 2 grupos: à base de gema de ovo (80 ml de solução de lactose a 11,0% e 20 ml de gema de ovo) e à base de lecitina (80 ml de solução de lactose a 11,0%, 80,0 g de lecitina e 20 ml de água destilada). O diluente III continha o diluente II mais 10,0% de glicerol e 1,5% de pasta Equex STM. Todos os parâmetros espermáticos medidos (motilidade total, viabilidade, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade de acrossoma) foram melhores no diluente à base de gema de ovo do que nos diluentes à base de lecitina. Os autores concluem que a substituição da gema de ovo por fosfatidilcolina comprometeu a qualidade do sêmen congelado.

LONG; CONN (2012) realizaram dois experimentos utilizando fosfatidilcolina extraída da gema do ovo de galinha em sêmen de peru congelado. O primeiro experimento consistiu na

determinação da incorporação da fosfatidilcolina na membrana plasmática do espermatozoide. Para tanto, os autores marcaram as moléculas de fosfatidilcolina com uma substância fluorescente, as quais foram adicionadas a 45 ejaculados em diferentes quantidades (0; 0,5; 2,5; ou 10,0 mg/mL) e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os autores observaram que o espermatozoide do peru incorporou a fosfatidilcolina na membrana plasmática de uma maneira tempo- e dose-dependente, sendo que a quantidade de 2,5 mg/mL foi mais eficiente na incorporação. Em um segundo experimento, foram acrescentadas diferentes quantidades de fosfatidilcolina (0; 0,5; 2,5; ou 10,0 mg/mL) em 75 ejaculados os quais foram armazenados a 4°C. Nas 24 h de armazenamento as amostras foram avaliadas para integridade de membrana, motilidade e fertilidade. Os autores observaram que não houve diferença para viabilidade de membrana e motilidade entre as quantidades de fosfatidilcolina. No entanto, 0,5 ou 2,5 mg/mL de fosfatidilcolina melhoraram a fertilidade do sêmen de peru após 24 h de armazenamento, indicando melhor capacidade de proteção acrossomal.

Apesar de os estudos com fosfatidilcolina em sêmen resfriado serem escassos e dos resultados obtidos com a criopreservação do sêmen suíno não serem promissores, a utilização de temperatura menos extrema do que o congelamento demonstrou um resultado positivo sobre a fertilidade do sêmen de peru, aparentemente por uma ação de proteção ao acrossoma, o que nos leva a pensar que a utilização dessa faixa de temperatura seja mais promissora para o estudo do sêmen suíno. Além disso, a fosfatidilcolina é capaz de se incorporar à membrana do espermatozoide do peru (LONG; CONN, 2012). Corroborando com esse resultado KASIMANICKAM; BUHR (2016) observaram que um pool de fosfolipídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, fosfatidilserina e fosfatidilinositol) foi capaz de se incorporar à membrana de 90% dos espermatozoides suínos, de uma maneira tempo e dose dependente. Esta eficácia de fusão pode ser usada para alterar a composição da membrana plasmática do espermatozoide e, com isso, as respostas funcionais da membrana.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

32 spermatozoa with intact plasma membrane than doses with 0% (80.2%, 78.7% and 74.8%,
33 respectively; $P < 0.0001$). Acrosome integrity was higher for doses with 2.0% PC (95.23%, 96.41%
34 and 97.62%; 0, 0.5 and 2.0% PC, respectively; $P = 0.003$). Doses stored at 6°C showed lower
35 membrane (69.2 and 84.8%) and acrosome integrity (95.6 and 97.3%) than doses stored at 17°C (P
36 < 0.0001). These results suggest that PC could be used as a membrane protector for boar
37 spermatozoa at low storage temperatures. Furthermore, PC seems to hold sperm motility during
38 long incubation at 38°C.

39

40 **Keywords:** phosphatidylcholine, boar semen, low temperature, membrane protector

41

42 INTRODUCTION

43

44 Boar semen is sensitive to low temperatures; thus, it is stored at temperatures around 15-
45 18°C (JOHNSON *et al.*, 2000). The cold sensibility of boar spermatozoa seems to be related with
46 plasmatic membrane lipidic composition, which is composed by different phospholipids and fatty
47 acids that lead to membrane phase separation at temperatures around 5°C (PARKES; LYNCH,
48 1992; YESTE, 2016). Another factor that contributes to boar spermatozoa cold sensitivity is the
49 cholesterol asymmetric distribution through the plasmatic membrane (JOHNSON *et al.*, 2000).
50 However, despite deleterious effects of low temperatures on boar sperm cells, hypothermic storage
51 provides a reduction in semen doses bacterial load (MENEZES, 2018; WABERSKI *et al.*, 2019),
52 contributing to the decrease in antimicrobial use on swine industry.

53 Some recent studies highlight that boar semen can be stored at 5°C, when diluted with
54 highly protective extenders (MENEZES, 2018; WABERSKI *et al.*, 2019). However, WABERSKI
55 *et al.* (2019) have observed that boar semen doses extended with Beltsville Thawing Solution (BTS,
56 short-term extender) did not hold the motility above 70% during storage, and doses storage at 5°C
57 extended with Androstar Premium (long-term extender) did not differ in the percentage of viable
58 sperm cell compared to doses stored at 17°C with BTS or Androstar Premium. These results
59 emphasize the importance of using membrane protective substances when boar spermatozoa are
60 submitted to cold shock or to low temperatures of storage. Today, extender compositions are not
61 available, therefore the protective substances used are publicly unknown.

62 Therefore, several substances have been studied regarding their protective attributes in boar
63 spermatozoa, such as phosphatidylcholine (PC). The PC is the most abundant phospholipid in
64 sperm cell and is able to be incorporated into the boar spermatozoa plasma membrane (PARKES;
65 LYNCH, 1992; KASIMANICKAM; BUHR, 2016). ALVAREZ-RODRIGUEZ, VICENTE-
66 CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ (2017) and PEARODWONG *et al.* (2019) have reported
67 no advantages for replacing egg yolk by different types and concentrations PC under
68 cryopreservation conditions. However, cryopreservation is more challenging to sperm cells than
69 hypothermic storage. In this way, LONG; CONN (2012) evaluated extended turkey semen with
70 different concentrations of a PC solution to be stored at 4°C. Those authors showed that 0.5 or 2.5
71 mg/mL of PC improved turkey semen fertility after 24 h of storage. This result indicates an
72 acrosomal protective capacity by PC. Few studies using PC on boar semen under hypothermic
73 storage are available. Therefore, PC could be a membrane protector for boar spermatozoa stored at
74 low temperatures. Thus, the objective of this study was to evaluate the protective capacity of PC in
75 boar semen under hypothermic storage diluted with short-term extender.

76

77

MATERIAL AND METHODS

78

Animals and facilities

79

80
81 The study was conducted in the research barn of the Swine Sector of Universidade Federal
82 do Rio Grande do Sul. Sixteen ejaculates from four mature boars (sireline 337, Agroceres PIC,
83 Laranjeiras do Sul, Brazil) were used. The boars were healthy, mature (> 24-month-old) and were
84 housed in individual pens. All boars had *ad libitum* access to water and were fed a corn-soybean
85 meal diet with 3.15 Mcal ME/kg, 15.0% crude protein (CP), and 0.68% standardized ileal digestible
86 lysine (SID Lys). The boars had a weekly interval between collections.

87

Experimental design, semen collection and processing

88

89
90 The ejaculate was collected by the gloved hand method into a pre-warmed (37°C) collection
91 cup equipped with a filter for removal of the gel fraction. Raw semen was weighed, and motility
92 and concentration were assessed by using a Computer-Assisted Semen Analysis (CASA system,

93 AndroVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Only ejaculates that fulfilled the criteria of
94 at least 70% of total motility and a minimum of 80% of morphologically normal spermatozoa were
95 used in the study.

96 Each ejaculate was diluted in a split sample design in Beltsville Thawing Solution (BTS,
97 Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) by using the isothermic one-step dilution. Semen doses
98 were produced with a final concentration of 1.5×10^9 sperm cells. A total of 18 semen doses were
99 produced from each ejaculate to meet both storage temperatures and analysis moments. The semen
100 was stored in 100 mL plastic bottles (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) with a total volume
101 of 50 mL. Before closing the bottles, PC (LIPOID S100, 98% pure soybean phosphatidylcholine,
102 LIPOID GmbH) was added into the semen doses as described below.

103 The treatments consisted of the combination of two storage temperatures (17 and 6 °C) and
104 three PC rates (0, 0.5 and 2.0 %) in a 2×3 factorial arrangement.

105 Semen doses were maintained at room temperature (22 - 24°C) for two hours until the
106 storage at 17°C or 6°C. Doses stored at 17°C were placed in a temperature-controlled cabinet
107 (Biotecno Refrigeração Médica BT-1100, RS, Brazil), and doses stored at 6°C in another
108 temperature-controlled cabinet (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). All semen doses remained
109 under controlled temperatures for 120 hours of storage. A data logger (Akso AK176, RS, Brazil)
110 was placed into an extra semen dose to control the temperature. For each moment of analysis (24,72
111 and 120 h), a different sealed bottle was used to avoid the influence of manipulation.

112

113 *Phosphatidylcholine preparation*

114

115 To guarantee total solubilization into the semen doses, a work solution of PC was prepared
116 using BTS at 50°C to reach a final concentration of 5% w/v. Aliquots of 20 mL were stored at -
117 20°C until use. Before each semen processing, the sample was thawed and held at 34°C.

118 A volume of 150 and 610 μ L of the PC solution was added into the semen doses to obtain
119 0.5% or 2%, respectively. Bottles were closed removing the air and gently rotated 10 times to
120 guarantee the PC homogenization. The control group had no addition of PC.

121

122 *Sperm motility analysis*

123

124 The CASA system was used to assess sperm motion traits at 15 min after dilution and 24,
125 72, and 120 h of storage. For stored doses, a thermo block was used to incubate an aliquot of 1 mL
126 of semen dose at 37 °C for 20 minutes. A 3- μ L sample was loaded by capillary flow into a chamber
127 slide (Leja[®] 20 μ m chamber depth, Nieuw Venne, The Netherlands) and then analyzed at \times 200
128 magnification under a phase contrast microscope (Axio Scope.A1, Zeiss[®], Germany) equipped
129 with a warm stage set on 37 °C.

130 The CASA system generated data regarding total and progressive motility as well as the
131 following kinematic parameters: VCL, curvilinear velocity (μ m/s); VSL, straightline velocity
132 (μ m/s); VAP, average path velocity (μ m/s); ALH, amplitude of lateral head displacement (μ m);
133 BCF, beat-cross frequency (Hz); LIN, linearity (VSL/VCL); STR, straightness (VSL/VAP); and
134 WOB, wobble (VAP/VCL). Software settings were adjusted for cell detection with a minimum
135 head size of 15 μ m and a maximum of 100 μ m. Sperm with ALH $<$ 1 μ m and VCL $<$ 24 μ m/s were
136 considered immotile. Progressive motility was defined as VCL $>$ 40 μ m/s and VSL $>$ 10 μ m/s.

137

138 *Acrosome integrity*

139

140 Acrosome integrity was assessed at 72 h of storage. An aliquot of extended semen (300 μ L)
141 was fixed in formalin-citrate solution (1 mL) and 200 spermatozoa were evaluated under phase
142 contrast microscopy at \times 1000 magnification. The acrosomal region of the spermatozoa was
143 characterized according to acrosome integrity as normal or defective with the latter comprising of
144 irregular shaped, disrupted, and detached acrosomes (PURSEL et al., 1972).

145

146 *Membrane Integrity*

147

148 Membrane integrity assessment was performed at 72 h of storage using a double-staining
149 method with the fluorescent probes SYBR14 and propidium iodide, PI (LIVE/DEAD[®] Sperm
150 Viability kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were prepared in a dark
151 room by adding 2.5 μ L of SYBR14/PI to 50 μ L of extended semen subsequent to which they were
152 incubated at 37 °C for 15 min in a thermo block. Two hundred stained spermatozoa were manually
153 counted (sperm in green as intact; sperm in orange as disrupted membrane).

154

155 *Thermo-resistance test (TRT)*

156

157 A thermoresistance test (TRT) was performed at 120 h of storage. A 15-mL aliquot of semen
158 dose was incubated at 38°C for 300 minutes in water bath (DeLeo BMED, RS, Brazil) using a
159 protocol adapted from Schulze *et al.* (2017). Sperm motility was assessed at 30 and 300 minutes of
160 incubation using the CASA system as described above.

161

162 *pH analysis*

163

164 The semen doses were subjected to pH measurements at 24, 72, and 120 h of storage. A
165 previously calibrated digital pH-meter (Kasvi, PR, Brazil) was used for this purpose. The pH
166 electrode was thoroughly washed with distilled water and wiped between samples.

167

168 *Statistical analysis*

169

170 Data resulting from the study were analyzed using the Statistical Analysis System software
171 (SAS, version 9.3; SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA). All variables obtained for sperm motility
172 traits and pH of stored doses were analyzed as repeated measures using the GLIMMIX procedure.
173 For 15-min analysis, the amount of PC was included as a fixed effect. For stored doses, temperature
174 of storage, amount of PC, storage time and their interactions were included as fixed effects in the
175 model. Data from the TRT assay at 120 h of storage were analyzed as repeated measures,
176 considering the incubation times at 38 °C (30 and 300 min). When the interaction among fixed
177 factors was significant, the results were explored accordingly, hence the effects of main factors
178 were not discussed. Boar and week of collection were included as random effects in all models.
179 Sperm motility, acrosome and membrane integrity were considered as binomial distribution. Sperm
180 kinematic traits and pH were fitted as normal distribution. Values are expressed as the mean ±
181 standard error of the mean. Temperature, PC amount, and storage time were compared using the
182 Tukey-Kramer test at a significance level of 5%.

183

184

RESULTS

Overall, percentages of total motility and progressive motility in raw semen were $95.7\% \pm 0.5$ and $93.4\% \pm 0.7$, respectively. After 15 minutes of dilution, total and progressive motility were higher ($P < 0.01$) for doses with 0 (94.3 and 91.8%, respectively) and 0.5% PC (93.7 and 91.0, respectively) when compared to doses with 2% PC (92.4 and 89.7, respectively).

Cooling curves

During the period of stabilization at room temperature, the temperature decreased in a rate of $1.62^{\circ}\text{C}/\text{h}$; whereas after storage, the cooling rate was $1^{\circ}\text{C}/\text{h}$ for doses stored at 6°C . For doses stored at 17°C , during the period of stabilization the cooling rate was $1.98^{\circ}\text{C}/\text{h}$ and after storage the cooling rate was $1.68^{\circ}\text{C}/\text{h}$. Cooling curves for both temperatures are shown in Figure 1.

Motility and kinematic traits

Total motility was affected by storage time ($P = 0.008$) and temperature ($P < 0.0001$). Doses stored at 17°C had greater total motility than doses stored at 6°C (86.6% and 73.3%, respectively; $P < 0.0001$). Total motility was higher at 72 h compared with doses of 24 h and 120 h of storage (80.1%, 81.5% and 80.6%, total motility at 24, 72 and 120 h of storage, respectively; $P \leq 0.040$; Figure 2), while no difference was observed between 24 h and 120 h of storage ($P = 0.340$). No effect was observed for PC and interactions ($P \geq 0.064$). Progressive motility was affected by the temperature of storage. Doses stored at 17°C had higher progressive motility than doses stored at 6°C (81.1% and 64.4%, respectively; $P < 0.0001$; Figure 3). PC, time of storage and their interaction did not influence progressive motility ($P \geq 0.086$).

All the kinematic variables are shown in Figure 4. The parameters VCL, VSL, VAP, LIN were affected by the interaction of storage temperature and time ($P \leq 0.007$). The VCL of doses stored at 6°C was lower at 24 h compared to 72 h and 120 h (90.9, 105.8 and $103.5 \mu\text{m}/\text{s}$, respectively; $P < 0.0001$), with no effects observed at 17°C (109.1, 111.2 and $108.0 \mu\text{m}/\text{s}$, respectively; $P \geq 0.24$). Also, VCL was lower at 6°C than at 17°C at 24 h of storage ($P < 0.0001$). The VSL of doses stored at 6°C and 17°C was lower at 24 h compared to at 120 h ($P \leq 0.04$), with

216 no difference for 72h ($P \geq 0.33$). The VSL was lower in doses stored at 6 °C, when compared to
217 those stored at 17°C during the whole storage ($P < 0.0001$). In doses stored at 6 °C, VSL was higher
218 at 24 h than at 120 h ($P = 0.044$); while at 17°C, VSL was lower at 24 h than at 120 h ($P = 0.022$).
219 Besides this interaction, VSL was greater for doses with 0 and 0.5% PC compared to doses with
220 2% PC (38.5, 38.5 and 35.3 $\mu\text{m/s}$, respectively; $P = 0.008$). Doses stored at 6°C had lower values
221 of VAP at 24 h compared to 72 and 120 h (44.1, 48.7 and 48.3 $\mu\text{m/s}$, respectively; $P < 0.0001$),
222 with no effect observed at 17°C ($P \geq 0.27$). The VAP was lower in doses stored at 6°C than at 17°C
223 during the whole storage ($P \leq 0.005$). Although doses stored at 17 °C did not show influence by
224 the temperature, VAP was greater at 72 h and 120h ($P < 0.0001$) than at 24h in doses stored at 6°C.
225 VAP was also influenced by the PC amount, with lower values found in doses with 2% PC (51.3,
226 51.4 and 47.3 $\mu\text{m/s}$, for 0, 0.5 and 2.0%, respectively; $P \leq 0.009$). At 24 h, LIN was similar between
227 the temperatures of storage, but was decreased in doses stored at 6°C at 72 and 120 h of storage. In
228 doses stored at 17°C, LIN was reduced at 120h of storage ($P \leq 0.003$). In the other hand, at 6°C of
229 storage, LIN was already reduced at 72h of storage ($P < 0.0001$).

230 The BCF was affected by storage time and temperature ($P \leq 0.0008$). BCF values were
231 lower at 120 h ($P \leq 0.005$), with no difference between 24 and 72 h ($P = 0.815$) (17.2, 17.0 and
232 16.3 Hz, for 24, 72 and 120 h of storage, respectively). Doses stored at 6°C had lower BCF
233 compared to doses stored at 17°C (14.8 and 18.9 Hz, respectively; $P < 0.0001$). No effect of PC
234 amount and interactions were found. The STR was affected by the interaction between storage time
235 and temperature ($P < 0.0001$), and also by the interaction between PC rate and temperature ($P =$
236 0.020). STR was negatively affected by the temperatures throughout the storage. However, semen
237 doses stored at 17°C showed an increased STR at 120h (78.7, 78.46 and 80.6%, for 24, 72 and 120h
238 of storage, respectively), while those stored at 6°C had reduced STR at 72h (76.8, 67.2 and 65.8%
239 for 24, 72 and 120h of storage, respectively). Within each PC rate, STR was greater in semen doses
240 stored at 17°C than at 6°C ($P < 0.0001$), with more pronounced difference in 2% of PC. There was
241 no effect of treatment and other interactions for STR ($P \geq 0.251$). The WOB was affected by the
242 interaction between storage time and temperature ($P < 0.0001$), and also by the interaction between
243 storage time and PC rate ($P = 0.037$). At 24 h of storage, WOB was greater at 6°C than at 17°C
244 (48.9 vs 47.6%, respectively). However, at 120 h, higher value was found in doses stored at 17°C
245 (46.9 vs 49.8% for 6°C and 17°C, respectively). Doses with 0% PC had no changes in WOB values

246 throughout the storage. In doses with 0.5 and 2% PC a slight reduction in WOB was found at 72 h.
247 There was no effect of treatment and other interactions for STR ($P \geq 0.112$).

248

249 *pH*

250

251 There was an effect of storage time and PC rate on the pH ($P \leq 0.021$; Figure 5). Doses with
252 0% had lower pH values than doses with 2% PC (7.24 and 7.27, respectively; $P < 0.05$), with no
253 difference to the rate 0.5% ($P > 0.05$). The pH was higher at 72 h than 24 and 120 h of storage,
254 while 120h was higher than 24 h of storage (7.24, 7.29, 7.25, pH values of 24, 72 and 120 h of
255 storage, respectively; $P < 0.05$). No significant effect was observed for temperature and interactions
256 ($P \geq 0.087$).

257

258 *Thermo-resistance Test*

259

260 The total and progressive motility at TRT analysis were affected by the 3-way interaction
261 among storage time, temperature and PC rate ($P \leq 0.05$; Figures 6 and 7). Regardless of the PC
262 rate, total and progressive motility were higher at 30 min than 300 min of incubation for doses
263 stored at 17°C ($P < 0.0001$), but were similar at 6°C ($P \geq 0.095$). At 30 and 300 min of incubation
264 there was no significant difference of total and progressive motility among PC rates for doses stored
265 at 6°C. However, at 300 min of incubation of doses stored at 17°C, higher total and progressive
266 motilities were observed in doses with 2.0% PC than doses with 0% (76.7% and 57.8% total
267 motility of doses with 2 and 0% of PC, respectively; 69.1% and 49.0% progressive motility for
268 doses with 2 and 0% of PC, respectively; $P < 0.05$). There was no difference of total (64.5%) and
269 progressive motility (55.2%) for 0.5% of PC ($P > 0.05$).

270

271 *Plasma Membrane Integrity*

272

273 There was an effect of temperature and PC rate on membrane integrity at 72 h of storage (P
274 < 0.0001 , Figure 8), with no significant interaction between them ($P > 0.627$). Doses stored at 6°C
275 had lower percentage of spermatozoa with intact plasma membrane than doses stored at 17°C
276 (69.2% vs. 84.8%, respectively; $P < 0.0001$). Doses with 2 and 0.5% had a higher percentage of

277 spermatozoa with intact plasma membrane than doses with 0% (80.2%, 78.7% and 74.8%,
278 respectively; $P < 0.0001$).

279

280 *Acrosome integrity*

281

282 There was an effect of temperature and PC rate on acrosome integrity at 72 h of storage (P
283 < 0.0001 , Figure 9), with no significant interaction between them ($P > 0.979$). Acrosome integrity
284 was different among 0, 0.5% and 2.0% PC rates (95.23%, 96.41% and 97.62%, respectively; $P \leq$
285 0.003). Doses stored at 6°C had lower percentage of intact acrosome than doses stored at 17°C
286 (95.6% and 97.3%, respectively; $P < 0.0001$).

287

288

DISCUSSION

289

290 *Motility traits*

291

292 Reduction in sperm motility in low-temperature storage has already been reported by other
293 studies (KATZER *et al.*, 2004; SCHMID *et al.*, 2013; MENEZES, 2018; WABERSKI *et al.*, 2019).
294 It is important to consider the threshold for swine artificial insemination is defined as 60% of motile
295 sperm (JOHNSON *et al.*, 2000). In a recent study, WABERSKI *et al.* (2019) showed high sperm
296 motility in semen doses with BTS and stored at 17°C or with Androstar Premium and stored at
297 17°C and 5°C. In contrast, the total motility was reduced in semen doses stored at 5°C with BTS.
298 Moreover, total motility of doses at 5°C – Androstar Premium was higher than 80% throughout the
299 144 h-storage. These results highlight the more protective characteristics of this new long-term
300 extender with a combination of highly effective membrane protecting agents and specialized
301 antioxidants that maintain optimal storage conditions for at least 7 days. On the other hand, BTS,
302 the extender used in our study, is a simpler extender without specialized buffer and protecting
303 agents that maintains the shelf life of semen for 3 days. In the present study, although extended
304 with BTS, doses stored at 6°C showed at least 70% of total motility at 120 h of storage. This great
305 result may be due to the cooling rate. MENEZES *et al.* (2018) achieved 70% of total motility in
306 doses stored at 5°C with a cooling rate of 1.6°C/hour, agreeing with our study that reached a cooling
307 rate of 1.68°C/hour after storage at 6°C. Semen handling has an important role on sperm membrane

308 integrity (LEAHY; GADELLA, 2011), and, because the boar spermatozoa is very sensitive to cold
309 shock, it is also important to ensure that the temperature curve has no abrupt changes (JOHNSON
310 *et al.*, 2000).

311 The increase in total motility at 72 h of storage observed in the present study is unusual,
312 since the aging process and reduced motility throughout storage is well documented (JOHNSON
313 *et al.*, 2000; PAULENZ; KOMMISRUD; HOFMO, 2000; HOU; MA; YANG, 2002).
314 Nevertheless, there was a slightly increase of 1% in total motility and this result may not be
315 biologically significant. Besides, MENEZES (2018) observed that semen doses extended with
316 Androstar Premium stored at 17°C showed a decrease in total motility at 120 h of storage, and no
317 difference was observed between 24 and 72 h of storage. Furthermore, semen doses stored at 5°C
318 showed higher total motility at 24 h of storage than at 72 and 120 h of storage. WABERSKI *et al.*
319 (2019a) have observed that sperm motility of doses stored at 5°C and extended with BTS
320 significantly declined during storage, while sperm motility of doses stored at 17 or 5°C extended
321 with Androstar Premium did not significantly decline during storage. Those results suggest that
322 some long-term extenders may prolong boar sperm shelf-live.

323 Results regarding PC in boar extended semen are scarce for liquid preservation. In turkey
324 semen, LONG; CONN (2012) observed no effect on motility from semen stored at 4°C with
325 different PC concentration (0.5, 2.5 or 10 mg/mL). These findings corroborate with the present
326 study, since PC did not show any effects on total and progressive motility. These results show that
327 despite the protection of plasma membrane and acrosome properties the addition of PC was not
328 able to affect sperm motility. In contrast, under cryopreservation conditions, PC was not able to
329 improve boar semen quality after thawing, when compared to egg yolk (ALVAREZ-
330 RODRIGUEZ, VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2017; PEARODWONG *et*
331 *al.*, 2019).

332

333 *pH*

334

335 Semen doses with 0% PC showed a slightly lower pH than semen doses with 2% of PC.
336 Such finding may be related to the pH of the PC solution (8.22) added into the semen doses in small
337 quantities. Despite the significative difference in pH, this finding is not biologically relevant since
338 in freshly ejaculated boar semen the pH varies between 7.2 and 7.5, and just below this values the

339 motility and metabolism of spermatozoa are reduced (JOHNSON *et al.*, 2000). Indeed, the variation
340 of pH was not able to interfere in the sperm motility throughout storage in the present study.

341 In addition to PC rate effect, the pH increased 0.05 from 24 to 72 h (7.24 to 7.29) in the
342 present study. This result corroborates with VYT *et al.* (2007) who observed that boar semen doses
343 extended with BTS and stored with a minimum content of air increased the pH (0.06) at 82 h of
344 storage at 17°C. The BTS is a short-term extender that contains sodium bicarbonate buffer
345 (JOHNSON *et al.*, 2000). During storage, the extender medium may lose CO₂ to the air
346 compartment within the semen tube. This phenomenon decreases as the amount of air within the
347 semen tube decreases, indicating the influence of small amounts of air on pH (VYT *et al.*, 2007).
348 These results are supported by VERONEZ *et al.* (2016); doses without air content in the semen
349 tube showed lower pH values than those with 25% and 50% of air content, semen extended with
350 50% of air showed the highest values. PAULENZ *et al.* (2000) observed that boar semen doses
351 extended with BTS and stored at 25 and 20°C had a significantly decrease in pH during 96 h of
352 storage, whereas boar semen doses at 15 and 10°C had a slightly increase in pH during 96 h of
353 storage. The authors suggest that pH variation may be temperature-dependent and possibly related
354 to the spermatozoa metabolism: as the temperature reduces, the spermatozoa metabolism also
355 reduces. However, in our study we found no difference in pH variation between storage
356 temperatures during the storage.

357 A study of DZIEKOŃSKA *et al.* (2017) indicated that sperm metabolism is influenced by
358 storage temperature. In that study, semen doses stored for 72 h at 5°C presented a marked reduction
359 in sperm mitochondrial activity, lower oxygen consumption, lower mitochondrial membrane
360 potential and ATP production. Sperm mitochondria has an important role on energy and reactive
361 oxygen species production, maintenance of sperm motility and other fundamental functions. All
362 these actions are carried out despite the low ability to energy production of the mitochondria
363 (RODRÍGUEZ-GIL; BONET, 2016). The anaerobic glycolysis is another main energy pathway
364 used by the sperm cell, which along with the mitochondrial respiratory process are considered the
365 major source of energy for the spermatozoa. The major metabolites originated from the glycolysis
366 are pyruvate, lactate, and CO₂ (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). According to KAMP *et al.*
367 (2003), boar semen doses stored at 15°C accumulated lactate in the extra cellular fluid at rates of
368 0.5 ± 0.1 nmol/min/10⁻⁸ spermatozoa, at the same time that the pH decreases during 20 h of storage.
369 We speculate that this pattern may explain the decrease in pH from 72 to 120 h of storage in our

370 study. Additionally, as BTS is a short-term extender, the buffering capacity may be overcome at
371 120 h, leading to the pH decrease.

372

373 *Thermo-resistance Test*

374

375 Thermo-resistance test consists of exposing spermatozoa to a long-time incubation (300
376 min) at 38°C to simulate the time and temperature conditions of the sperm into the female
377 reproductive tract (SCHULZE *et al.*, 2019). MENEZES *et al.* (2018) evaluated sperm motility of
378 boar semen after TRT in doses stored under low temperature (5°C) or at 17°C, with or without
379 antimicrobials. Semen doses with antimicrobials stored at 17°C had higher motility after TRT than
380 doses stored at 5°C. Furthermore, total and progressive motility were higher at 30 min than 300
381 min of incubation at 38°C for both temperatures. Those results corroborate in parts with results of
382 the present study, where at 30 min of incubation, the total and progressive motility were higher
383 than at 300 min of incubation for doses stored at 17°C. On the other hand, semen doses stored at
384 6°C did not differ in total and progressive motility between 30 and 300 min of incubation at 38°C
385 in our study. Such findings may be related to the PC rate applied in the semen doses in the present
386 study, or possibly, with the energy metabolism of the sperm cells. Boar spermatozoa under 35°C
387 consumes oxygen at rates of $14.4 \pm 2.4 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-8}$ per spermatozoon, whereas
388 spermatozoa stored at 15°C reduced oxygen consumption by 90% to 1.4 ± 0.2 (KAMP *et al.*, 2003).
389 Those results indicate that the storage of semen at lower temperatures may reduce even more
390 oxygen consumption, and as a consequence, a higher decrease of spermatozoon metabolism will
391 occur. In this way, we can speculate that spermatozoa could save energy during storage at 6°C,
392 being able to resist further on incubations for 300 min at 38°C. In addition, the effect of PC rates
393 on doses stored at 17°C indicates that PC might be a source of energy to the spermatozoa. This
394 speculation is supported by JONES; BUBBS (2000), who observed that boar spermatozoa
395 incubated in the presence of (R,S)- α -bromohydrin phosphate, an inhibitor of the FAD-linked
396 mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase, an inhibitor of stage two of the glycolytic
397 pathway, produced measurable amounts of glycerol 3-phosphate after 5 h of incubation at 34°C. A
398 source for glycerol 3-phosphate could be the degradation of phospholipids present in the
399 membrane, which leads to the production of the compound (JONES; GILLIAN, 1996). In this
400 respect, spermatozoa stored at 17°C with 2% PC may have used the phosphatidylcholine as an

401 energy source during the 300 min of incubation at 38°C. This explains the fact that a higher total
402 and progressive motility at 300 min of incubation was observed, in contrast to semen doses
403 prepared without PC. Likewise, this could be the reason for the maintenance of total and
404 progressive motility during 300 min of incubation at 38°C of doses stored at 6°C.

405

406 *Membrane and acrosome integrity*

407

408 Boar spermatozoa are sensitive to temperatures below 15°C which is related to phospholipid
409 composition and phase transition of the boar spermatozoon membrane (WATSON, 1995). In this
410 way, MENEZES (2018) observed that acrosome integrity increased according to temperature being
411 the highest for semen doses stored at 17°C (96,8%, 94,3 and 93,6%, 17°C, 10°C and 5°C,
412 respectively). Likewise, the percentage of intact membrane was lower for semen doses extended
413 with Androstar Premium stored at 5°C and 10°C than 17°C (83.4%, 83.7% and 87.1%,
414 respectively). In contrast, WABERSKI *et al.* (2019) did not observe difference among semen doses
415 extended with Androstar Premium, stored at 17°C and 5°C, with semen doses extended with BTS
416 and stored at 17°C (92.1%, 89.2%, 90.3%, respectively). The only difference was observed in
417 semen doses extended with BTS and stored at 5°C, which presented lower membrane integrity.
418 Such results corroborate with the results from the present study, in which semen doses stored at
419 6°C showed lower membrane and acrosome integrity than semen doses stored at 17°C.
420 Furthermore, it was observed that semen doses with 2% and 0.5% PC presented a higher level of
421 membrane integrity than semen doses without PC, regardless the temperature. Acrosome integrity
422 was also improved with the increased of PC rate. In addition, doses with 2% PC stored at 6°C
423 reached similar values for acrosome integrity than doses with 0% PC stored at 17°C (97.0% and
424 96.3%, respectively). These results reveal the membrane protective capacity of PC on boar
425 spermatozoa stored under low temperatures. Also, these findings are similar with recent studies
426 using Androstar Premium, a new extender with highly effective membrane protecting agents and
427 specialized antioxidants.

428 Conversely to our results, some authors tried to use PC on boar semen cryopreservation;
429 however, results were not promising (ALVAREZ-RODRIGUEZ, VICENTE-CARRILLO;
430 RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2017; PEARODWONG *et al.*, 2019). Phosphatidylcholine were
431 unable to prevent cryodamage when compared with the egg-yolk based extender in both studies.

432 Furthermore, LONG; CONN (2012) evaluated the use of PC for turkey semen storage at 4°C. It
433 was observed that PC was incorporated in a dose-dependent manner in turkey spermatozoon
434 membrane during the first 12 h of storage. Sperm motility and viability at 24 h of storage were not
435 improved with the addition of PC, but a concentration of 0.5 or 2.5 mg PC/mL markedly improve
436 the overall fertility traits of turkey semen stored for 24 h.

437

438

CONCLUSION

439

440 Phosphatidylcholine increased membrane and acrosome integrity in boar sperm cells stored
441 at 6°C and 17°C. Furthermore, total and progressive motility were higher after TRT in semen doses
442 stored at 17°C with 2% of phosphatidylcholine. This study proposes the use of phosphatidylcholine
443 as a membrane protector for boar semen stored at 6°C and 17°C.

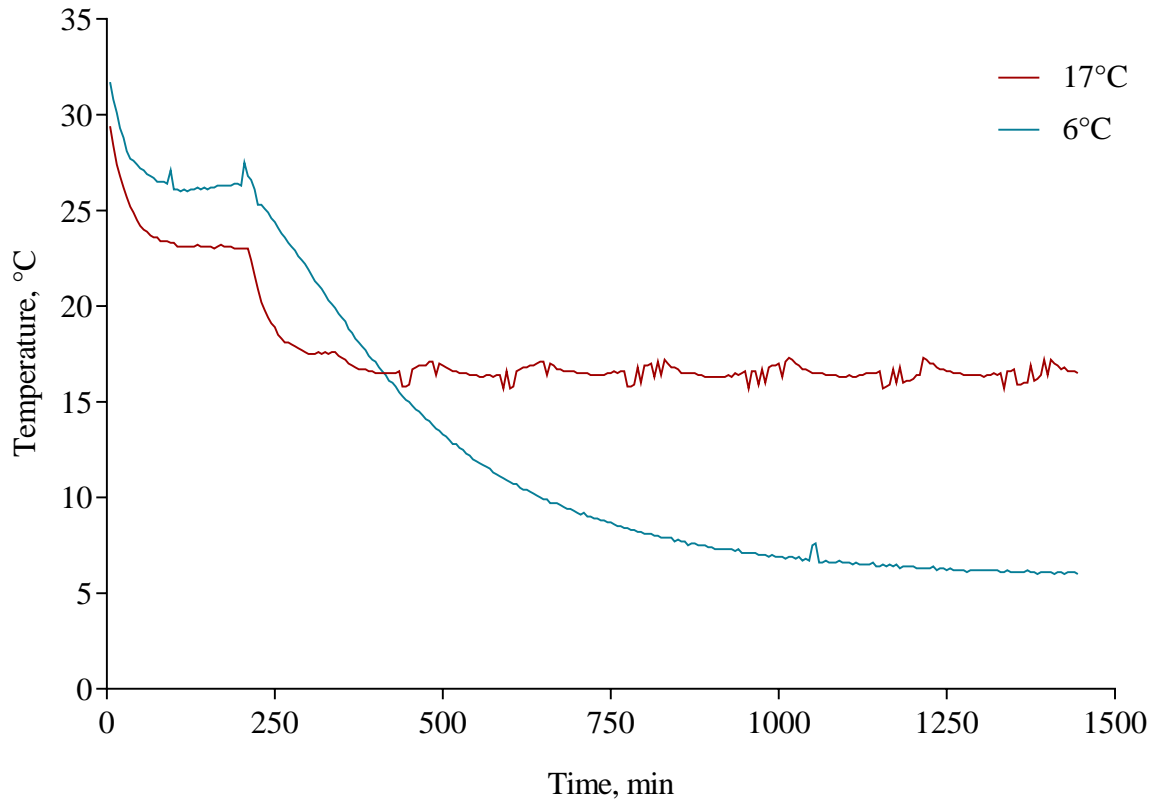
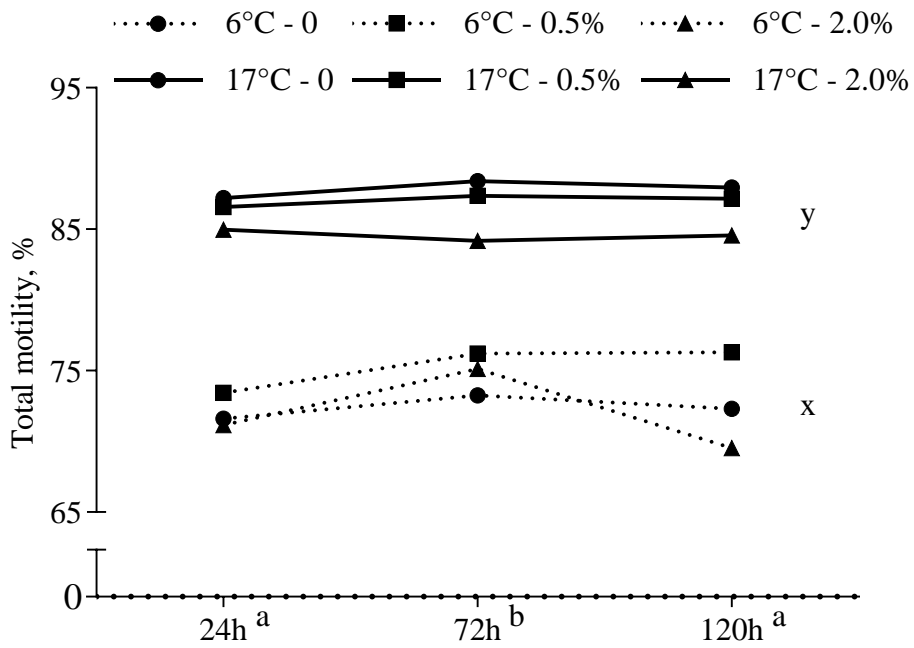
FIGURES**Figure 1** - Cooling curves of doses stored at 17°C and 6°C.

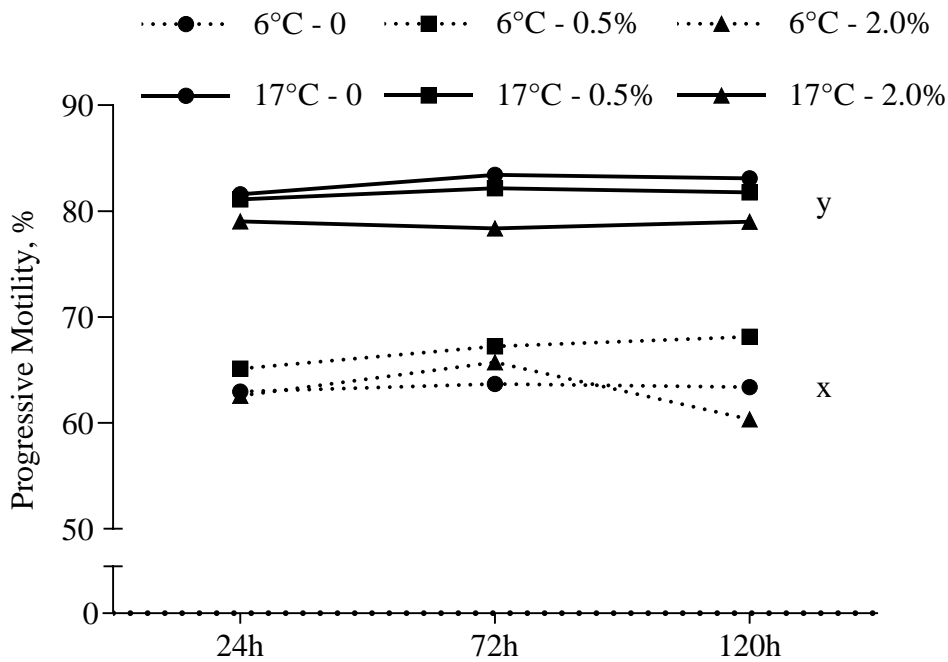
Figure 2 - Total motility according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).



a and b indicate significant difference among phosphatidylcholine rates ($P < 0.05$).

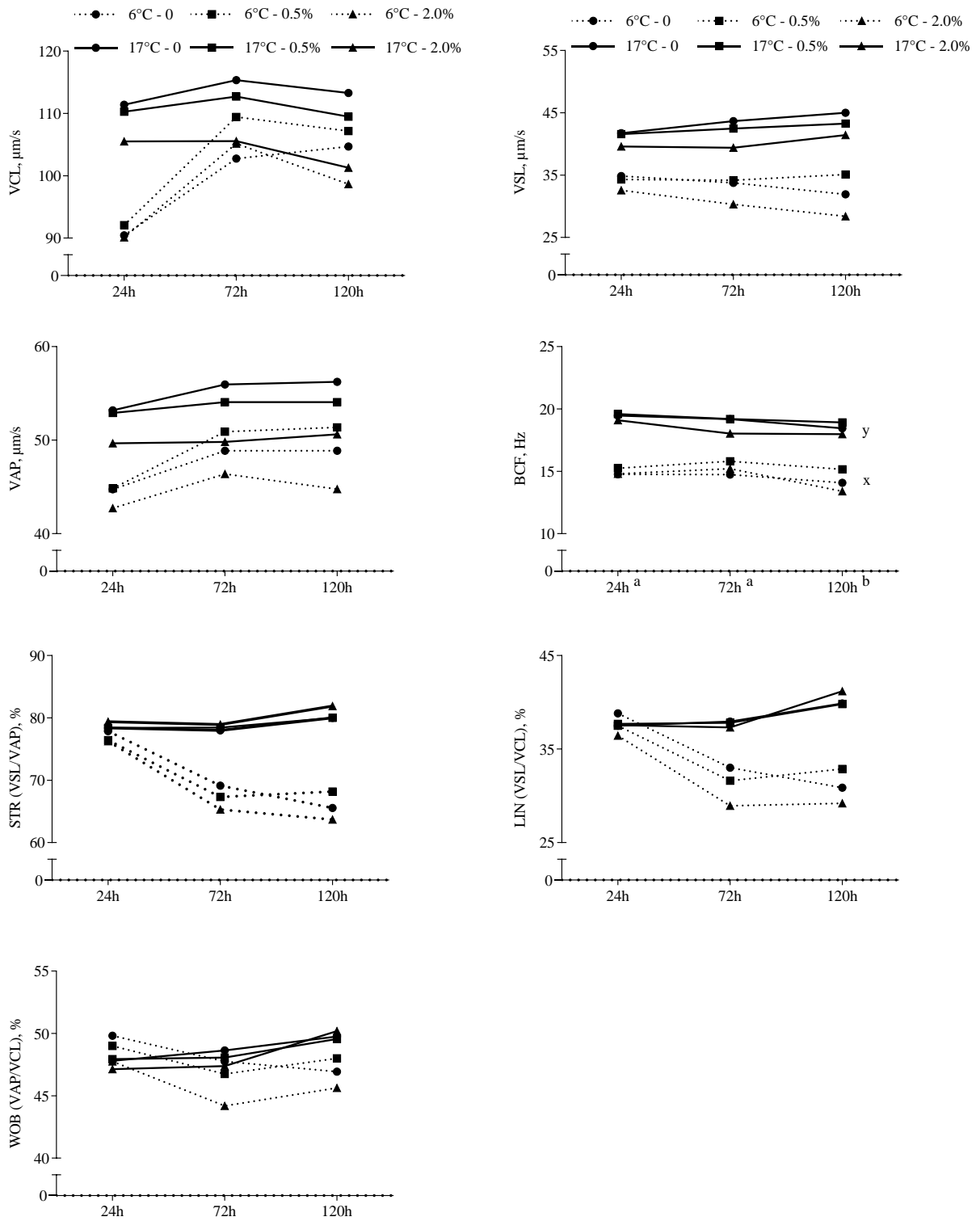
x and y indicate significant difference between storage temperatures ($P < 0.0001$).

Figure 3 - Progressive motility according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).



x and y indicate significant difference between storage temperatures ($P < 0.0001$).

Figure 4 - Kinematic traits according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).



Effects: Storage temperature ($P < 0.0001$) = BCF

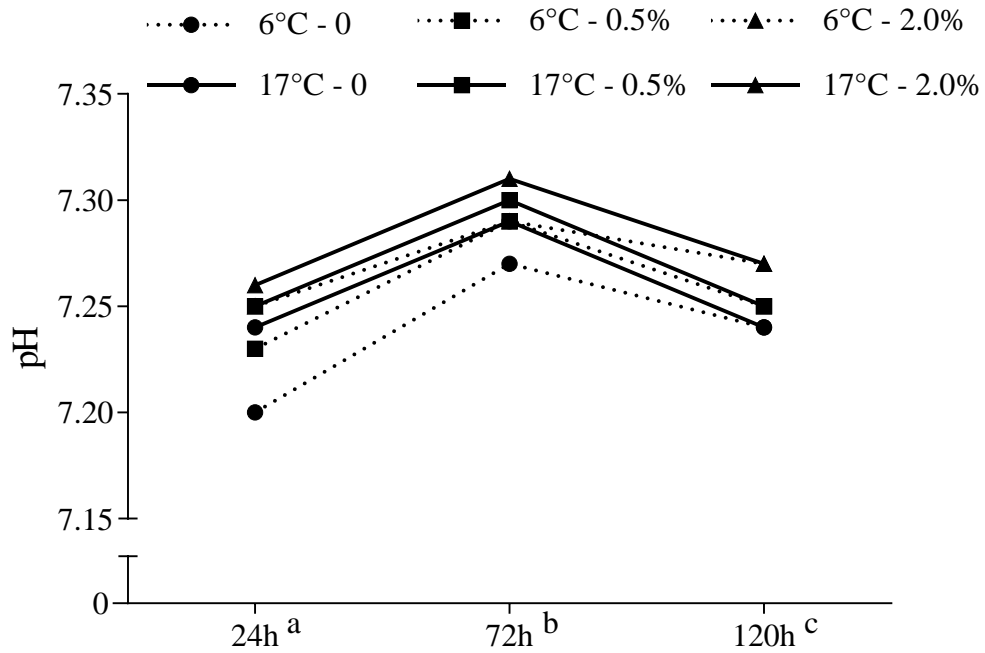
Storage time ($P < 0.05$) = BCF

Phosphatidylcholine rate ($P < 0.05$) = VSL, VAP

Interaction storage temperature x storage time ($P < 0.05$) = VCL, VSL, VAP, LIN, STR.

Interaction storage temperature x phosphatidylcholine rate ($P < 0.05$) = STR.

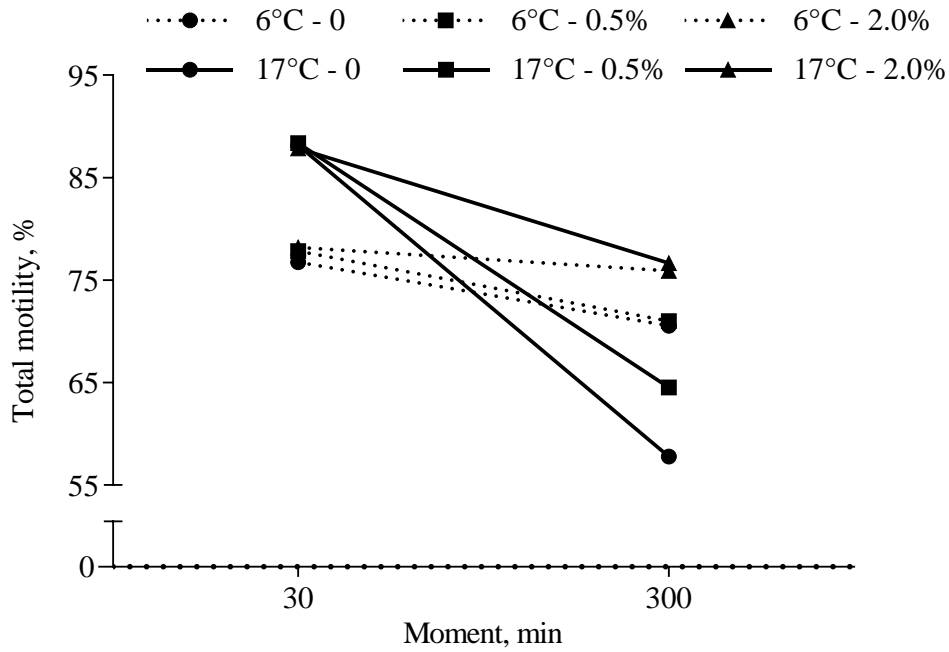
Figure 5 – pH according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).



Effects: a, b and c indicate significant difference among storage times ($P < 0.05$).

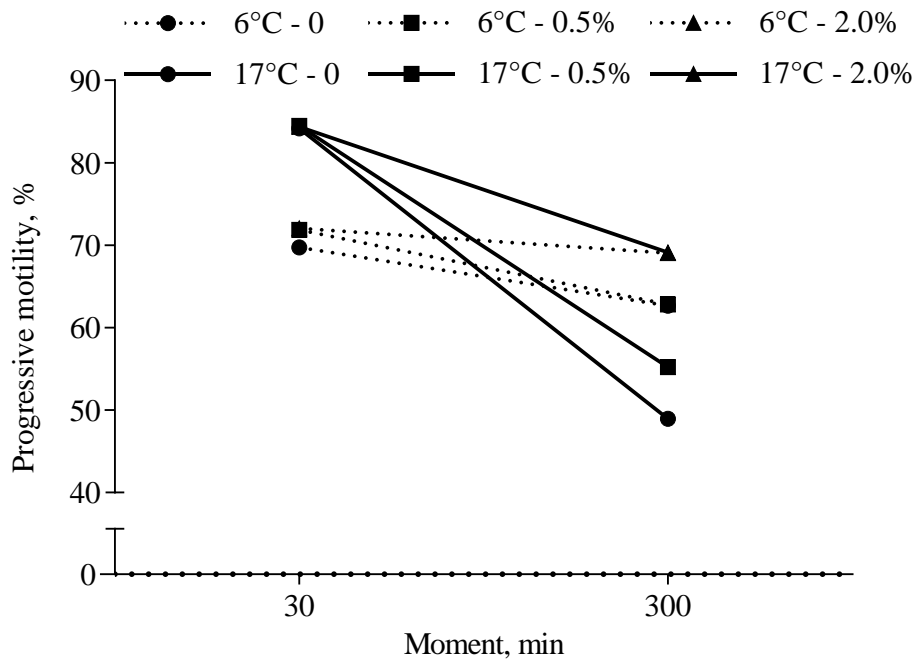
Phosphatidylcholine rate ($0^a, 0.5\%^a, 2.0\%^b$; $P < 0.05$).

Figure 6 - Total Motility of TRT according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).



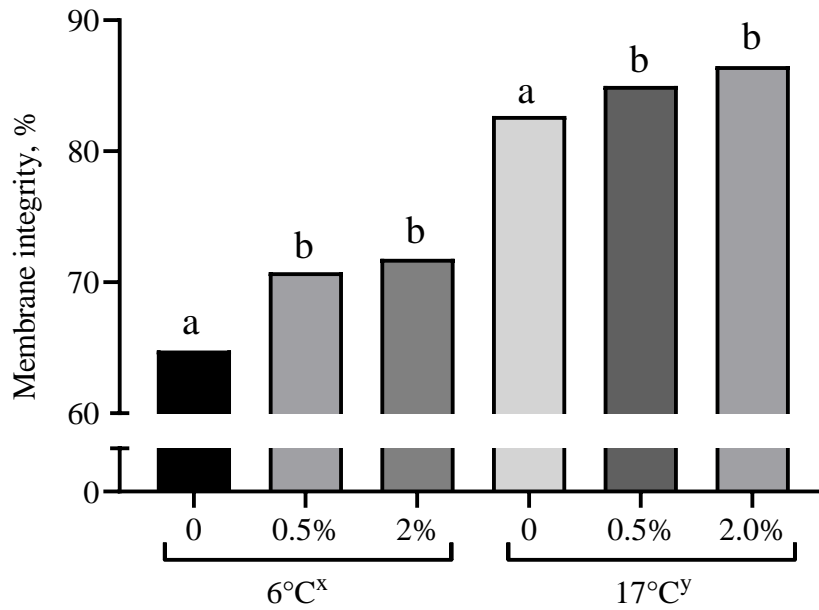
Effect: 3-way interaction - storage temperature x storage time x phosphatidylcholine rate (P = 0.03).

Figure 7 - Total Motility of TRT according to PC rates during storage at both temperatures (6 and 17°C).



Effect: 3-way interaction - storage temperature x storage time x phosphatidylcholine rate (P = 0.05).

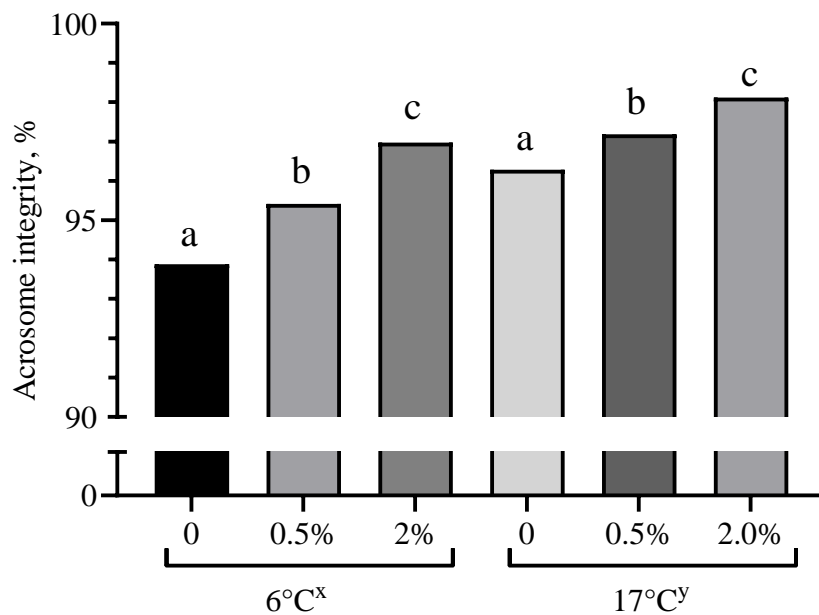
Figure 8 - Membrane integrity according to PC rates at 72 hours of storage at both temperatures (6 and 17°C).



a and b indicate significant difference among phosphatidylcholine rates ($P < 0.0001$).

x and y indicate significant difference between storage temperatures ($P < 0.0001$).

Figure 9 - Acrosome integrity according to PC rates at 72 hours of storage at both temperatures (6 and 17°C).



a, b and c indicate significant difference among phosphatidylcholine rates ($P < 0.0001$).

x and y indicate significant difference between storage temperatures ($P < 0.0001$).

REFERENCES

- ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; VICENTE-CARRILLO, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Exogenous Individual Lecithin-Phospholipids (Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol) Cannot Prevent the Oxidative Stress Imposed by Cryopreservation of Boar Sperm. **Journal of Veterinary Medicine and Surgery**, v. 1, n. 1, 2017.
- DZIEKOŃSKA, A. *et al.* Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. **Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 1, p. 127-133, 2017.
- JOHNSON, L. A. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, 2000.
- JONES, A. R.; BUBB, W. A. Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, n. 1, p. 129-136, 2000.
- JONES, A. R.; GILLAN, L. Metabolism of glycerol 3-phosphate by mature boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 106, n. 2, p. 321-327, 1996.
- KAMP, G. *et al.* Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction-Cambridge**, v. 126, n. 4, p. 517-525, 2003.
- KASIMANICKAM, V. R.; BUHR, M. M. Fusion of boar sperm with nanoliposomes prepared from synthetic phospholipids. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 4, p. 461-466, 2016.
- KATZER, L. H. *et al.* Qualidade de sêmen suíno resfriado sob a influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. **ARS Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 233-241, 2004.
- LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759-778, 2011.
- LONG, J. A.; CONN, T. L. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. **Poultry science**, v. 91, n. 8, p. 1990-1996, 2012.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. In: **Male Reproductive Function and Semen**. Springer, London, 1981. p. 196-197.
- MENEZES, T. A. Avaliação da temperatura de armazenamento e uso de antimicrobianos na qualidade de doses seminais de suínos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2018.
- PARKS, J.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PAULENZ, H.; KOMMISRUUD, E.; HOFMO, P. O. 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.

PEARODWONG, P. *et al.* Replacing egg yolk with lecithin in the semen extender compromises the quality of frozen-thawed boar sperm. **Theriogenology**, v. 137, p. 127-128, 2019.

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

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 4-11, 2016.

SCHMID, S. *et al.* The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 376-386, 2013.

SCHULZE, M. *et al.* Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 127, p. 15-20, 2019.

VERONEZ, C. R. *et al.* The influence of air contact on the quality of extended boar semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-7, 2016.

VYT, P. *et al.* Air contact influences the pH of extended porcine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 218-220, 2007.

WABERSKI, D. *et al.* Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 135-140, 1996.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.

4. CONCLUSÃO

Tendo em vista que o armazenamento de doses inseminantes de suínos em baixas temperaturas é dependente de diluentes que promovam alta proteção de membrana plasmática, atualmente novas substâncias estão sendo estudadas a fim possibilitar o armazenamento hipotérmico dessas doses. A fosfatidilcolina possui a capacidade de se incorporar à membrana do espermatozoide suíno e, em perus, consegue melhorar a fertilidade pela proteção que confere ao acrossoma (LONG; CONN, 2012; KASIMANICKAM; BUHR, 2016). No presente trabalho foi observado que a fosfatidilcolina melhorou a integridade de membrana e acrossoma em doses armazenadas tanto a 6 quanto a 17°C. Além disso, a motilidade total e progressiva foram maiores após o TTR para doses inseminantes armazenadas a 17°C com 2% de fosfatidilcolina. Ainda é importante salientar que para as doses armazenadas a 6°C a motilidade se manteve constante ao longo da duração do TTR. Não foi evidenciado efeito da fosfatidilcolina sobre a motilidade total e progressiva das doses avaliadas. Assim, com base nesses resultados, a fosfatidilcolina caracteriza-se por apresentar ação protetora sobre a membrana plasmática e acrossoma de espermatozoides suínos em doses armazenadas a 6 e 17°C. Contudo, mais estudos são necessários a fim de determinar qual a concentração ideal de fosfatidilcolina a ser adicionada nas doses inseminantes de suínos.

REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 573-584, 2005.
- ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; VICENTE-CARRILLO, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Exogenous Individual Lecithin-Phospholipids (Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol) Cannot Prevent the Oxidative Stress Imposed by Cryopreservation of Boar Sperm. **Journal of Veterinary Medicine and Surgery**, v. 1, n. 1, 2017.
- CEROLINI, S. *et al.* Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 99-111, 2000.
- DZIEKOŃSKA, A. *et al.* Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. **Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 1, p. 127-133, 2017.
- FERREIRA, F.M. *et al.* Processamento e armazenamento das doses inseminantes. **Suinocultura em Ação – Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Palotti, cap.8. p. 91-105, 2005.
- GADEA, J. semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.
- GADELLA, B. M.; LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 74-84, 2014.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700-1708, 2012.
- HUO, L.; MA, X.; YANG, Z. 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.
- JAKOP, U. *et al.* In vitro supplementation with unsaturated fatty acids improves boar sperm viability after storage at 6° C. **Animal reproduction science**, v. 206, p. 60-68, 2019.
- JOHNSON, L. A. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, 2000.
- JONES, A. R.; BUBB, W. A. Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, n. 1, p. 129-136, 2000.
- JONES, A. R.; GILLAN, L. Metabolism of glycerol 3-phosphate by mature boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 106, n. 2, p. 321-327, 1996.

KAMP, G. *et al.* Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction-Cambridge**, v. 126, n. 4, p. 517-525, 2003.

KASIMANICKAM, V. R.; BUHR, M. M. Fusion of boar sperm with nanoliposomes prepared from synthetic phospholipids. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 4, p. 461-466, 2016.

KATZER, L. H. *et al.* Qualidade de sêmen suíno resfriado sob a influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. **ARS Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 233-241, 2004.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759-778, 2011.

LONG, J. A.; CONN, T. L. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. **Poultry science**, v. 91, n. 8, p. 1990-1996, 2012.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. In: **Male Reproductive Function and Semen**. Springer, London, 1981. p. 196-197.

MENEGAT, M. B. Avaliação de parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo frente à homogeneização de doses de sêmen suíno armazenadas em diferentes diluentes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

MENEZES, T. A. Avaliação da temperatura de armazenamento e uso de antimicrobianos na qualidade de doses seminais de suínos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2018.

PARKS, J.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PAULENZ, H.; KOMMISRUDE, E.; HOFMO, P. O. 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.

PEARODWONG, P. *et al.* Replacing egg yolk with lecithin in the semen extender compromises the quality of frozen-thawed boar sperm. **Theriogenology**, v. 137, p. 127-128, 2019.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of animal science**, v. 40, n. 1, p. 99-102, 1975.

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

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 4-11, 2016.

SCHMID, S. *et al.* The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 376-386, 2013.

SCHULZE, M. *et al.* Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 127, p. 15-20, 2019.

VERONEZ, C. R. *et al.* The influence of air contact on the quality of extended boar semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-7, 2016.

VYT, P. *et al.* Air contact influences the pH of extended porcine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 218-220, 2007.

WABERSKI, D. *et al.* Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019a.

WABERSKI, D. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. **Theriogenology**, 2019b.

WABERSKI, D. *et al.* The initial fertilizing capacity of longerm-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. **Theriogenology**, v. 41, n. 7, p. 1367-1377, 1994.

WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 135-140, 1996.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.