



Pontos críticos na central de difusão genética

Critical points in the genetic diffusion center

**Carine Dahl Corcini^{1,5}, Karina Lemos Goularte², Andreia Nobre Anciuti², Sara Lorandi Soares³,
Antonio Sergio Varela Junior⁴**

¹Departamento de Patologia Animal, ReproPEL, Faculdade de Veterinária- UFPel- Pelotas, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

⁴Instituto de Ciências Biológicas, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

⁵Correspondência: corcinicd@gmail.com

Resumo

A suinocultura brasileira tem uma expectativa de crescimento de 2,4% para o ano de 2017, segundo ABPA. Com o crescimento do setor foi necessária a automatização que gerou maior eficiência na produção de doses inseminantes de suínos em centrais de difusão genética, considerando que as biotécnicas utilizadas buscam otimizar o material genético dos machos, sendo tanto na diminuição do número de células espermáticas por dose, como no número de doses por inseminação. Torna-se cada vez mais necessária a implantação de programas de controle de qualidade com métodos responsáveis para garantir um produto com maior segurança ao produtor. O objetivo da presente revisão foi descrever etapas no processamento da dose inseminante que afetam a qualidade seminal.

Palavras-chave: temperatura, diluente, contaminação, cachaço.

Abstract

Brazilian pig farms have an expected growth of 2.4% for the year 2017, according to ABPA. With the growth of the sector it was necessary the automation that generated greater efficiency in the production of inseminating doses of pigs in genetic diffusion centers. Considering that the biotechniques used seek to optimize the genetic material of the males being both in the decrease of the number of sperm cells per dose as in the number of doses per insemination. Thus, it is increasingly necessary to implement quality control programs with responsible methods to guarantee a product with greater security to the producer. The aim of the present review was to describe steps in insemination dose processing that affect seminal quality.

Keywords: temperature, extender, contamination, boar.

Introdução

Estima-se que mais de 85% das granjas suínolas tecnificadas no Brasil utilizam a inseminação artificial, levando a uma maior expectativa do cliente de receber uma dose de sêmen de alta qualidade. Desta forma o manuseio adequado durante a coleta e o processamento de sêmen é extremamente importante para a manutenção da qualidade da dose produzida.

Durante as etapas de coleta de sêmen, diluição, envase e transporte das doses devem ser levados em conta dois pontos, o controle da temperatura e a higiene, pois influenciam diretamente na qualidade e no tempo de duração das doses produzidas. Porém, ainda não é possível estimar quanto se perde com as doses inseminantes que são descartadas ou até mesmo utilizadas sem um controle de qualidade.

Desta forma, o objetivo desta revisão é relatar fatores relevantes durante o processamento do sêmen que possam vir a afetar a qualidade da dose inseminante.

Qualidade da água e diluentes

Atualmente o método mais utilizado para a conservação do sêmen suíno para a inseminação artificial é a refrigeração por até 72h, no intervalo de temperatura de 16 a 18°C. Mas para que isto seja possível é necessária uma correta preparação do diluente, utilizando-se água de alta qualidade (Schulze et al., 2015). Os centros de coleta e processamento (CCP) possuem equipamentos modernos para produção de água, como: osmose reversa e desinfecção da água por ultravioleta, que devem ter manutenção periódica.

A qualidade da água deve ser monitorada por suas características físicas, químicas e biológicas. Em CCP de sêmen suíno a água para o preparo de diluentes deve apresentar valores adequados de osmolaridade, pH e ser livre de contaminação microbiana.

Erros na preparação do diluente, principalmente na osmolaridade e no pH da solução podem comprometer a qualidade da dose de sêmen, diminuindo, conseqüentemente, a taxa de fertilização. A

osmolaridade adequada encontra-se entre 240 a 380 mosm. A diferença de gradiente osmótico favorece o efluxo ou influxo de água pela membrana plasmática, assim, diluentes hipo ou hipertônicos levam ao encolhimento ou inchaço da célula espermática, respectivamente (Petrunkina et al., 2007).

Meios hipotônicos são prejudiciais para a célula espermática levando a defeitos morfológicos como cauda enrolada, além de redução da integridade da membrana, levando a morte celular. Por outro lado, meios hipertônicos afetam negativamente a membrana plasmática e a funcionalidade das mitocôndrias, sendo esses efeitos refletidos em diminuição da motilidade espermática (Schulze, 2015).

Outro parâmetro importante de avaliação do diluente é o pH, que deve encontrar-se entre 7,2 e 7,5. Vyt et al. (2004), encontraram uma correlação negativa entre o pH e a motilidade espermática, comparando cinco diferentes diluentes comerciais durante 7 dias de armazenamento. A variação do pH pode ocorrer por diversos fatores, sendo um fator de extrema relevância, a produção de toxinas por bactérias. Pinart et al. (2016) demonstrou que doses infectadas com *Clostridium perfringens* de 10^1 a 10^7 UFC mL⁻¹ sofrem alcalinização além do fisiológico a partir de 5 dias de incubação. Esse aumento do pH, induz a reação acrossomal precocemente comprometendo a qualidade da dose inseminante Cross, (2007).

Na preparação do diluente são adicionados alguns íons na forma de tampão como por exemplo, bicarbonato e/ou citrato de sódio e cloreto de potássio, com o objetivo de manter a funcionalidade da bomba de Na⁺K⁻ das células. Outro tipo de tampão são os compostos zwitteriônicos ou anfóteros, que tem a capacidade de capturar os metais pesados e controlar o pH da solução. Como substância quelante, principalmente de Ca⁺⁺, adiciona-se aos diluentes o ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA), diminuindo a aglutinação das células, conferindo, assim, maior tempo de armazenamento da dose líquida para IA. Ainda, são incluídos rotineiramente agentes antimicrobianos aos diluentes para evitar a proliferação dos microrganismos naturalmente presentes no sêmen (Johnson et al., 2000)

Os diluentes comerciais apresentam pH e osmolaridade adequados com a finalidade de proteger as células espermáticas do choque osmótico e da variação do potencial hidrogeniônico, além de prevenir o crescimento microbiano. Eles podem ser classificados como diluentes de curta (três a quatro dias), média (cinco a seis dias) e longa (sete a oito dias) duração. Em sua grande maioria, as doses inseminantes são utilizadas entre três a quatro dias pós-coleta. Como opção para granjas localizadas distantes do CCP de sêmen suíno como opção para granjas localizadas distantes das CCP de sêmen suíno surgiram os diluentes de média e longa duração, pois solucionam também os problemas no fornecimento de doses nos finais de semana e feriados (Pinart et al., 2015; Bortolozzo et al., 2005; Waterhouse et al., 2004).

Contaminação das doses

Através da IA, o sêmen diluído contendo células espermáticas viáveis é depositado dentro do trato reprodutivo da fêmea. Apesar do controle sanitário rigoroso que as granjas realizam e da utilização de reprodutores saudáveis e livres de patógenos específicos (Althouse e Rossow, 2011), o risco de contaminação do ejaculado com contaminantes de origem animal ou não-animal é uma possibilidade à ser considerada (Maes et al., 2008).

O ejaculado suíno contém usualmente entre 10^4 a 10^5 bactérias/mL (Sone M., 1990), na sua maioria gram-negativas, com um grande percentual pertencente à família Enterobacteriaceae (Althouse e Lu, 2005). Portanto, a obtenção de um ejaculado livre de microrganismos é praticamente inalcançável (Thibier e Guerin, 2000). Por outro lado, sabe-se que a excessiva contaminação bacteriana reduz a viabilidade espermática (Althouse, 2008; Bussalleu et al., 2011; Sepúlveda et al., 2014), principalmente através da indução de apoptose e necrose, que pode ser parcialmente responsável pela redução da motilidade espermática (Moretti et al., 2009).

Fontes de contaminação microbiana do sêmen podem ser classificadas como de origem animal ou não-animal, sendo a animal devido à infecção geral ou local, com liberação dos contaminantes no trato reprodutivo. Ainda, podem ser provenientes de fluidos da cavidade prepucial, secreção respiratória e fezes durante a coleta. A contaminação de origem não-animal provém dos colaboradores envolvidos na coleta e processamento do sêmen, da água utilizada durante os processos, dos sistemas de ventilação e de qualquer equipamento, utensílio ou bancada usada no processo (Maes et al., 2008).

A contaminação bacteriana excessiva além de poder afetar a qualidade *in vitro* do ejaculado (Moretti et al., 2009) e diminuir a longevidade das doses produzidas, pode reduzir também o tamanho da leitegada (Maroto Martín et al., 2010). Maroto Martín e colaboradores (2010) identificaram que a partir de $3,5 \times 10^3$ UFC/ml de *Escherichia coli* pode haver redução no tamanho da leitegada. Dessa forma, eles sugerem que deveria ser realizada uma avaliação prévia do ejaculado quanto a contaminação microbiana e que o ejaculado apresentando contagem de *E. coli* igual ou maior que o valor citado seja descartado.

Dessa forma, as doses de sêmen produzidas nos CCP devem conter a menor contaminação possível (Hueston e Sivula, 1988). Para isso, antibióticos são adicionados aos diluentes para controlar o crescimento bacteriano (Speck et al., 2014). Entretanto, apenas essa manobra muitas vezes não é suficiente para evitar um crescimento excessivo, identificando-se com frequência bactérias isoladas de doses diluídas resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados (Althouse et al., 2000, 2008)

Muitas fontes de variação, fisiológicas, metodológicas e operacionais, podem influenciar a qualidade do produto final (Alvarez et al., 2005). A fisiologia do animal é pouco influenciável pelo homem, quando o animal é manejado e criado sob condições satisfatórias. Entretanto, as questões metodológicas e operacionais dentro de um fluxo de produção de doses de sêmen sofrem influência diária dos colaboradores que as exercem.

A contaminação cruzada das doses pode acontecer por superfícies, equipamentos ou vidrarias mal higienizadas ou, ainda, através de um colaborador que não recebeu o devido treinamento para higienização das mãos, vestimenta e questões de saúde. O treinamento dos colaboradores, fator chave para qualquer sistema de produção, aliado ao sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), que identifica os perigos químicos, físicos e microbiológicos, apontando as medidas preventivas e ações corretivas (Codex Committee on Food Hygiene, 2009), padroniza o sistema de produção, reduzindo a chance de ocorrência de qualquer perigo. "coloquei uma vírgula juntando as frases, acho que fica melhor.

Os princípios do APPCC têm sido usado para identificar pontos críticos de controle higiênicos, relacionados a contaminação das doses produzidas (Schulze et al., 2015). Ainda, sistema semelhante utilizando os princípios do mesmo sistema foi recentemente desenvolvido para CCP de sêmen bovino, identificando os perigos físicos, químicos e microbiológicos (Goularte et al., 2015).

Embora o risco de transmissão de doenças através da IA seja mínimo, o impacto da utilização de doses contaminadas pode ser enorme, especialmente se um grande número de rebanhos está envolvido (Maes et al., 2008). Nem todas as bactérias isoladas possuem o mesmo impacto sobre o espermatozoide (Kuster e Althouse, 2016). Entretanto, o efeito negativo parece ser concentração-dependente (Althouse et al., 2000), reduzindo a longevidade durante o armazenamento, expresso através da aglutinação espermática, baixa motilidade, lesão no acrossoma, perda da integridade e funcionalidade da membrana plasmática espermática (Kuster e Althouse, 2016).

Estratégias efetivas para minimizar o risco de contaminação bacteriana das doses de sêmen produzidas, incluindo programas de monitoramento, são necessárias (Kuster e Althouse, 2016). A implantação de programas de qualidade como o APPCC, usado para controlar rigorosamente todo o processo com o objetivo de garantir a qualidade uniforme do produto final, vêm sendo proposta (Schulze et al., 2015; Goularte et al., 2015).

Temperatura, diluição e curva de resfriamento

Os espermatozoides são células altamente especializadas e compactas, contudo, demonstram fragilidade frente às questões relacionadas à temperatura e choque térmico (Ashish et al., 2017). Alguns estudos demonstram que as ocorrências de falhas reprodutivas podem ser reflexo direto da qualidade seminal (Ashish et al., 2017), sendo assim, é de fundamental importância o conhecimento e cumprimento das exigências visando um produto de qualidade.

Para isso, o controle da temperatura é uma etapa fundamental, começando na coleta do ejaculado, até sua estabilização durante o armazenamento da dose. A temperatura é considerada um perigo, tornando as etapas onde seu controle é fundamental em pontos críticos para a produção de doses inseminantes com qualidade. O diluente, também conhecido como extensor, representará para a célula uma fonte de energia, garantindo pH e osmolaridade adequados, capaz de inibir o crescimento de microorganismos, além de proteger as células do choque térmico (Medrano et al., 2005; Estienne et al., 2007; Gogol et al., 2009).

Normalmente as centrais de difusão de genética seguem o seguinte fluxograma de produção: coleta do ejaculado, avaliação da motilidade, verificação da concentração, diluição, envase, armazenamento em conservadora com temperatura entre 15 a 17°C. É no momento da coleta do ejaculado que a curva de resfriamento tem seu início. A maior parte dos protocolos estabelece que a diluição da amostra (1:1) deverá ocorrer assim que possível, não ultrapassando o tempo máximo de 30 minutos sendo esta diluição realizada de forma isotérmica (Waberski, 2009). O diluente deve ser pré-aquecido até atingir a temperatura do ejaculado em questão (geralmente em torno de 33°C), sendo permitida uma variação máxima de 1°C (Waberski, 2009).

Após aferição da motilidade e concentração para o cálculo das doses, é realizada a diluição final para que as doses fiquem com 3×10^9 espermatozoides/100 mL. Uma vez diluído, sua temperatura será reduzida neste momento, até atingir 17°C, temperatura usual nas conservadoras de sêmen das centrais. O tipo de embalagem deve propiciar a adequada circulação de ar entre as doses, evitando pontos de difícil refrigeração. Quando as doses são mantidas em temperatura próxima à fisiológica, as células não reduzem seu metabolismo, acarretando em rápida redução da qualidade seminal (Petrunikina et al., 2005). O inverso, com a redução da temperatura a valores inferiores a 12°C também leva a efeitos deletérios sobre a qualidade da amostra. Temperaturas em torno de 5 a 12°C, também conhecidas como faixa de transição, podem influenciar negativamente sobre a organização das estruturas fundamentais da membrana celular (Althouse et al., 1998) aumentando a fluidez causando lipoperoxidação de membrana, além de reduzir a atividade enzimática (Parks e Lynch, 1992).

A temperatura adequada a cada etapa deve ser monitorada criteriosamente em todos os momentos, evitando flutuações de temperatura. A suscetibilidade da célula espermática suína a oscilações de temperatura está principalmente relacionada à composição de fosfolípidios presentes em sua membrana. Quando a temperatura é reduzida bruscamente a fase lipídica da membrana sofre desordem, de modo que sua função ficará



comprometida, podendo ainda acarretar danos e alterações nos canais de íons, bem como na estrutura das proteínas. O número de patologias também pode ser alterado em consequência do descontrole da temperatura, já que as células apresentarão defeitos em sua morfologia, como por exemplo, cauda enrolada (Schulze, 2015), principalmente, quando forem expostas a situações de choque térmico.

De modo geral, a oscilação de temperatura será responsável por reduzir o tempo de armazenamento da dose, bem como queda no desempenho das células. O impacto ainda maior será na queda da taxa de fertilização, com altas taxas de retorno ao estro, menor número de leitões nascidos totais e podendo vir a antecipar o descarte de fêmeas de forma errônea, levando a um menor ganho na cadeia produtiva de suínos.

Um outro ponto importante para a implantação dos controles de qualidade, seria a avaliação das doses inseminantes após todas as etapas por onde passa a dose inseminante. Uma forma de verificação seria o envio das doses a centros de referência em análise espermática, que podem possibilitar uma vasta informação sobre a qualidade da dose inseminante gerando informações que determinam em quais possíveis etapas podem estar ocorrendo a perda de qualidade espermática. Nestes centros é possível se estabelecer parâmetros de cinética espermática e funcionalidade celular. Além disso, esses centros podem oferecer treinamento às equipes do CCP e das granjas, dispondo sempre de pessoal capacitado, otimizando os talentos humanos. A visão holística que é ofertada nestes cursos permite o entendimento que cada integrante é peça fundamental para o sucesso de todo o processo.

Conclusão

Com a implantação de animais geneticamente superiores ao plantel é necessária a produção de doses inseminantes com máximas chances de fertilização. Dessa forma, torna-se extremamente importante a implantação de programas de qualidade no processamento de sêmen suíno que sejam capazes de manter sob controle os perigos de contaminação bacteriana, choque térmico e osmótico, identificados em várias etapas do processamento consideradas pontos de controle na produção de doses de qualidade, possibilitando ainda, uma maior confiança na dose produzida.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil) pelas bolsas de doutorado atribuída a Andréia Nobre Anciutti e Sara Lorandi Soares e PNPd a Dr^a. Karina Lemos Goularte. Assim como, as bolsas de pesquisadores Dr. Antonio Sergio Varela Junior (307195/2015-7) e Dr^a. Carine Dahl Corcini (306356/2014-7).

Referências

- Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M.** Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v.50, p.535-543, 1998.
- Althouse GC.** Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.374-378, 2008.
- Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM.** Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine sêmen. *Theriogenology*, v.53, p.1167-1176, 2000.
- Althouse GC, Lu KG.** Bacteriospermia in extended porcine sêmen. *Theriogenology*, v.63, p.573-584, 2005.
- Althouse GC, Pierdon MS, Lu KG.** Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine sêmen. *Theriogenology*, v.70, p.1317-1323, 2008.
- Althouse GC, Rossow K.** The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.64-67, 2011.
- Alvarez C, Castilla JA, Ramírez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernández A, Gaforio JJ.** External quality control program for semen analysis: spanish experience. *J Assist Reprod Gen*, v.22, p.379-387, 2005.
- Ashish S, Bhure SK, Harikrishna P, Ramteke SS, Muhammed Kutty VH, Shruthi N, Ravi Kumar GV, Manish M, Ghosh SK, Mihir S** Identification and evaluation of reference genes for accurate gene expression normalization of fresh and frozen-thawed spermatozoa of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.92, p.6-13, 2017.
- Bortolozzo FP, Wentz I, Dallanora D.** Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.17-32, 2005.
- Bussalleu E, Yeste M, Sepúlveda L, Torner E, Pinart E, Bonet S.** Effects of different concentrations of enterotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci* v.127, p.176-182, 2011.
- Codex Committee on Food Hygiene.** HACCP system and guidelines for its application, Annexe to CAC/RCP 1-1969, Rev 3 in Codex Alimentarius Commission Food Hygiene Basic Texts, Food and Agriculture Organization, ed. (Rome). 2009.
- Cross NL.** Effect of pH on the development of acrosomal responsiveness of human sperm. *Andrologia*, v.39,



p.55-9, 2007.

Estienne MJ, Harper AF, Day JL. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod Biol*, v.7, p.221-31, 2007.

Gogol P, Szczesniak-Fabianczyk B, Wierzchos-Hilczner A. The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod Biol*, v.9, p.39-49, 2009.

Goularte KL, Madeira EM, Ferreira CER, Duval EH, Mondadori RG, Vieira AD, Lucia TJr. Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system for a bull semen production center. *Reprod Domest Anim*, v.50, p.972-979, 2015.

Hueston WD, Sivula N. Lab and barn hygiene: using hazard analysis critical control point approach for investigating semen quality problems. In: NAAB (Ed), *Proc 12th Tech Conf Art Insem Reprod*. Milwaukee, WI, USA.1988; pp.15-18, 1988.

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

Kuster CE, Althouse GC. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology* v.85, p.21-26, 2016.

Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A, Soom AV. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, v.70, p.1337-1345, 2008.

Maroto Martín LO, Muñoz EC, De Cupere F, Van Driessche E, Echemendia-Blanco D, Rodríguez JM, Beeckmans S. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.95-104, 2010.

Medrano A, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Variations in the proportion of glycolytic/non-glycolytic energy substrates modulate sperm membrane integrity and function in diluted boar samples stored at 15-17°C. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.445-53, 2005.

Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Gen*, v.26, p.47-56, 2009.

Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-66, 1992.

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

Petrunkina AM, Harrison RA, Tsoleva M, Jebe E, Topfer-Petersen E. Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume. *Reproduction*, v.133, p.61-73, 2007.

Pinart E, Yeste M, Prieto-Martínez N, Reixach J, Bonet S. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after two days of storage: does the type of extender really matter? *Theriogenology*, v. 83(9), p. 1428-37, 2015.

Pinart E, Domènech E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. *Anim Reprod Sci*, v.177, p.65-78, 2017.

Schulze M, Ammon C, Rüdiger K, Jung M, Grobbel M. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*, v.83, p.430-437, 2015.

Schulze M, Rüdiger K, Jung M, Grossfeld R. Use of refractometry as a new management tool in AI boar center for quality assurance of extender preparations. *Anim Reprod Sci*, v.152, p.77-82, 2015.

Sepúlveda L, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci*, v.150, p.96-106, 2014.

Sone M. Investigations on the control of bacteria in boar semen. *J Anim Reprod*, v.36, p.23-9, 1990.

Speck S, Courtiol A, Junkes C, Dathe M, Muller K, Schulze M. Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *PLoS One*, v.9, p.e105949, 2014.

Thibier M, Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.233-251, 2000.

Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Van Soom. A Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim*, v.39, p.8-12, 2004.

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

Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstd W. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology*, v.62, p.1638-1651, 2004.