



Armazenamento de sêmen suíno a 5°C – Quais são os desafios?

Boar semen preservation at 5°C – What are the challenges?

Aline Fernanda Lopes Paschoal^{1*}, Alana Birck Ribeiro¹, Ana Paula Gonçalves Mellagi²,
Fernando Pandolfo Bortolozzo²

¹Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Xanxerê, Santa Catarina, Brasil

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Introdução

Levando em consideração a mobilização mundial gerada pelo cenário de resistência bacteriana, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas, com o intuito de reduzir o uso de antimicrobianos. No contexto da reprodução de suínos, devemos considerar que as doses inseminantes contêm antimicrobianos para o controle bacteriano, e que mais de 70% do volume infundido de uma dose sofre refluxo, propiciando o desenvolvimento de bactérias resistentes no ambiente (Steverink et al., 2007). A produção mundial de doses é estimada em aproximadamente 14 milhões de litros ao ano, ou seja, a presença e disseminação de bactérias resistentes no ambiente após a IA é preocupante (Waberski, 2019). Além disso, laboratórios de processamento de sêmen suíno ocasionam a coexistência de bactérias com antimicrobianos e desinfetantes, o que, também, pode promover a resistência bacteriana nas doses (Waberski, 2019).

Com o objetivo de reduzir a resistência bacteriana, a suinocultura está revendo conceitos e buscando estratégias para o uso racional de antimicrobianos. A redução da temperatura convencional (17°C) de armazenamento para um armazenamento de doses livres de antimicrobianos a 5°C é uma estratégia bastante promissora, (Waberski et al., 2019; Menezes et al., 2020; Paschoal et al., 2020; JÄKEL et al., 2021), mas com desafios para os espermatozoides devido à sua sensibilidade ao resfriamento (Waberski et al., 2019). O objetivo desse artigo é descrever os desafios enfrentados pelos espermatozoides para manutenção da qualidade durante o armazenamento a 5°C livre de antimicrobianos. *Sensibilidade do espermatozoide suíno ao resfriamento.*

A redução da temperatura de armazenamento de 17 para 5 °C é uma estratégia promissora para viabilizar a redução do uso de antimicrobianos em doses inseminantes suínas (Waberski et al., 2019; Paschoal et al., 2020; Jäkel et al., 2021). O armazenamento hipotérmico a 5 °C promove uma redução do crescimento bacteriano quando comparadas àquelas armazenadas a 17 °C (P < 0,05) durante 120 horas de armazenamento (MENEZES et al., 2020). No entanto, o resfriamento a 5°C significa um desafio para a qualidade espermática devido à sensibilidade dos espermatozoides suínos ao resfriamento a temperaturas abaixo de 15 °C (Watson et al., 1995; Waberski et al., 2019; Paschoal et al., 2020).

A redução da temperatura está associada à mudança na organização e na composição da bicamada lipídica da membrana espermática (Buhr et al., 1994). Buhr et al. (1994) explicam que a medida em que a temperatura decresce, os fosfolipídios adquirem restrição no seu movimento lateral visto que as cadeias laterais de ácidos graxos tendem a se tornar menos móveis. Fosfolipídios puros em bicamadas demonstram uma transição de estado fluido para estado de gel ao atingirem a temperatura de transição, próxima aos 10 a 15 °C, abaixo da qual formam uma matriz hexagonal (Parks e Lynch, 1992). No entanto, quando a natureza dos fosfolipídios é mista, como no caso dos suínos, há uma grande variedade de composições das cadeias laterais, resultando em diferentes temperaturas de transição. Se os grupos lipídicos têm diferentes temperaturas de transição pode ocorrer a separação de fases, na qual algumas proteínas ficam agrupadas enquanto outras ficam excluídas das matrizes hexagonais de lipídios gelificados (De Leeuw et al., 1990).

O colesterol presente nas membranas espermáticas também pode influenciar o comportamento lipídico (Parks e Lynch, 1992). A ação do colesterol é ampliar as transições de fase o que acaba minimizando a alteração e separação de fases. Sendo assim, a proporção colesterol/fosfolipídio tem um papel importante na fluidez das membranas plasmáticas, e espécies com maior concentração de colesterol são menos susceptíveis aos danos causados pela baixa temperatura. No caso das células espermáticas de suínos, a proporção colesterol/fosfolipídio é menor (0,20) quando comparada à de outras espécies como carneiros (0,85), touros (0,83) e garanhões (0,36), o que resulta em mais danos ao resfriamento do sêmen pela baixa tolerância ao choque térmico pelo frio (Amann e Graham, 1993; Parks e Graham, 1992; Purdy,

*Correspondência: alinepaschoal3@gmail.com

Recebido: 20 de outubro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



2006). Nesse sentido, diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar estratégias para minimizar as consequências do resfriamento, como a diluição bitérmica do ejaculado (López-Rodríguez *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2015) e a implementação de diferentes estratégias de resfriamento até a temperatura de armazenamento (Katzner *et al.*, 2005).

Atualmente, um diluente que promete a preservação da qualidade espermática submetida à baixa de temperatura de armazenamento está sendo estudado. Utilizando esse diluente, Menezes *et al.* (2020) verificaram que doses processadas em diluentes com antimicrobianos (apramicina e de ampicilina) e armazenadas a 17 °C apresentaram motilidade total, progressiva e integridade de acrossoma superiores quando comparadas às doses processadas com diluentes sem antimicrobianos e armazenadas a 5 °C. No entanto, a motilidade espermática total e progressiva observada em doses armazenadas a 5°C foi superior (85,0% ± 1,0 e 77,7% ± 1,2, respectivamente) ao limiar mínimo aceitável (70%) para inseminação artificial (Johnson *et al.*, 2000). Ao avaliar os resultados de fertilidade de 817 porcas e 158 leitões inseminados duas vezes ao dia, com doses contendo 4 bilhões e 2,2 bilhões de espermatozoides em 90 em 50 mL, respectivamente e com doses armazenadas a 17 °C com antimicrobianos e 5 °C sem antimicrobianos, Waberski *et al.* (2019) verificaram que a taxa de retorno ao estro, taxa de parto e tamanho de leitegada foram semelhantes entre os grupos.

Cuidados no resfriamento de doses de sêmen suíno

A resistência do espermatozoide ao estresse do resfriamento em situação de decréscimo lento de temperatura já é conhecida (Watson, 1995), apesar de os mecanismos ainda não serem completamente elucidados. Manter o sêmen diluído por até 24h a temperaturas próximas a 15 °C estabiliza a arquitetura lipídica da membrana plasmática (Casa e Althouse, 2013) e eleva o nível de fosforilação de resíduos de diversas proteínas espermáticas, incluindo a proteína de choque térmico HSP70 (Yeste *et al.*, 2015). Nesse sentido, os protocolos de criopreservação de sêmen implementam um período extenso de estabilização, o que também está sendo recomendado para o armazenamento a 5 °C (Casa e Althouse 2013). No entanto, períodos extensos de estabilização de doses a temperaturas superiores a 15 °C podem favorecer a contaminação bacteriana, o que gera a falha no armazenamento de doses a 5 °C. Sendo assim, o ideal seria promover o resfriamento com curvas balanceadas, evitando assim, os efeitos negativos da injúria celular ocasionada pelo resfriamento abrupto (como já discutido nesta sessão) e o crescimento bacteriano. As curvas de resfriamento ideais para promover um cenário ótimo de resfriamento foram sugeridas em um estudo recente realizado por Paschoal *et al.* (2020), na qual se estipulou uma janela de resfriamento que permitisse qualidade espermática ótima e baixa contaminação bacteriana durante todo o armazenamento.

Fontes de contaminação bacteriana

Apesar de o sêmen suíno ser considerado livre de bactérias, o processo de coleta e a produção de doses resultam, frequentemente, em contaminação (Althouse e Lu, 2005). Essa carga bacteriana inicial representa mais um desafio aos espermatozoides que serão armazenados a 5 °C, visto altas contaminações iniciais podem resultar em dose com alto grau de contaminação subsequente. No caso de ejaculados de reprodutores suínos saudáveis se espera que as fontes de contaminação se originem do animal, o que inclui como fonte de contaminação as fezes, secreções prepuciais, secreções respiratórias, pelos e pele (Althouse e Lu, 2005; Maes *et al.*, 2008; Waberski, 2019). Existem ainda causas não relacionadas ao cachaço, que incluem principalmente o ambiente, o material, a técnica de fixação do pênis empregada e a água utilizada no diluente (Goldberg *et al.*, 2013; Schulze *et al.*, 2015; Paschoal *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Althouse *et al.* (2000) foram identificadas como fontes de contaminação animal as fezes, os fluidos da cavidade prepucial e os pelos. Concomitante com o resultado deste estudo, foi observado por Goldberg *et al.* (2013) que ao se utilizar o método da mão enluvada para coleta de sêmen, quando o líquido oriundo do divertículo prepucial entra em contato com a luva do coletador e escorre para o copo de coleta há maior razão de chance (4,3; $P = 0,001$) para que ejaculados tenham contagem de mesófilos totais superior a 220 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹). Além disso, ainda nesse estudo, se constatou que quando a duração é superior a sete minutos aumenta-se em 2,2 vezes a razão de chance de se obter ejaculados com contaminação superior a 220 UFC mL⁻¹ ($P = 0,035$) (Tabela 1). As fontes de contaminação do sêmen suíno também incluem o coletador, com contaminação oriunda dos cabelos, pele, secreções respiratórias e luvas por eles utilizadas (Maes *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2013). Em um estudo recente (Paschoal *et al.*, 2021), foi observado ainda que a



técnica utilizada para fixação do pênis em métodos de coleta semi-automática, também exerce efeito na contaminação bacteriana presente no ejaculado, principalmente nos casos em que uma menor qualidade higiênica está presente no ambiente de coleta (Tabela 1).

Tabela 1: Principais fatores de risco de origem animal ou não animal que contribuem de forma significativa com a contaminação bacteriana em unidades de difusão genética de acordo com diferentes estudos.

Autores	Fator
<i>Althouse et al., 2000</i>	Fezes
	Fluídos do divertículo prepucial
	Pele/ pelos
	Coletador
	Água (sistemas de destilação e osmose reversa)
<i>Althouse e Lu, 2005</i>	Ar/sistema de ventilação
	Secreções prepuciais
	Secreções respiratórias
	Pelo e pele
	Pele e pelos
<i>Maes et al., 2008</i>	Coletador
	Luvas de coleta
<i>Goldberg et al., 2013</i>	Unidade de difusão genética
	Líquido prepucial que escorre pela luva do coletador
	Duração da coleta superior a 7 minutos
	Pênis escapou durante a coleta manual
	Higiene da luva de coleta
	Idade do cachaço
<i>Schulze et al., 2015</i>	Unidade de difusão genética
	Estufas de aquecimento
	Sistema de transporte: coleta – laboratório
	Diluyente
	Tanque de diluição
	Corantes de identificação de doses
	Elementos de manipulação
	Sistema de água (pias e ralos)
Água utilizada no diluyente	
<i>Paschoal et al., 2021</i>	Unidade de difusão genética
	Técnica de fixação do pênis (coleta semi-automática)
	Tempo da coleta
	Limpeza do prepúcio

A variedade de bactérias contaminantes do sêmen suíno é bastante vasta, sendo bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae as mais comuns (Althouse e Lu, 2005). Ao avaliar 88 amostras de sêmen suíno processado, Althouse et al. (2008) verificaram que 57% das amostras apresentavam bactérias Gram negativas, das quais 54% eram da família Enterobacteriaceae e 30% da família Pseudomonadaceae. Entre as Gram positivas, a mais frequentemente isolada foi a *Leifsonia aquática* (20%). Gączarzewicz et al. (2016) realizaram um estudo no qual 99% das amostras de ejaculados suínos avaliados tiveram presença de bactérias aeróbicas, com amplitude de 80 a 370 milhões de UFC mL⁻¹. Althouse & Lu (2005) identificaram as bactérias *Alcaligenes* spp *xylosoxydans*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Xanthomonas maltophilia* como as mais comumente encontradas nos ejaculados suínos em estudo realizado na América do Norte. Em estudo realizado na Europa, de um total de 60 ejaculados suínos de 13 rebanhos europeus, foi observada contaminação em 63% das amostras, das quais foram isoladas cepas de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp., *Streptococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Bresciani et al., 2014).

Para verificar as principais fontes de contaminação de doses inseminantes presentes dentro do ambiente laboratorial de unidades de difusão genética (UDG), Schulze et al. (2015) elencaram pontos



críticos de higiene não associados aos reprodutores ou coleta de sêmen, mas sim à linha de fluxo de trabalho durante a produção na central (Tabela 1). Foram avaliados estufas de aquecimento dos copos de coleta, sistema de transporte do ejaculado do local de coleta ao laboratório, os diluentes, a face interna dos tanques de diluição, os corantes de identificação das doses, elementos de manipulação (quadros, telefone, teclado dos computadores), superfícies das bancadas do laboratório, sistema de tratamento da água, pias ou drenos de escoamento e a água utilizada no diluente (Schulze *et al.*, 2015).

Um fator de extrema importância quando se pensa em doses é a qualidade da água que deve ser pura e livre de bactérias, pois a disseminação do agente bacteriano poderia comprometer um volume significativo das doses produzidas. Para isso, a água passa por diversos processos que removem partículas grosseiras, com filtração e ultrafiltração, além de deionização e osmose reversa (Silva *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2010).

Altos níveis de contaminação bacteriana do sêmen (bacteriospermia) estão diretamente associados com o comprometimento da qualidade espermática de doses inseminantes (Althouse *et al.*, 2000; Althouse e Lu, 2005). Os efeitos deletérios gerados pela bacteriospermia podem ser ocasionados pela ação direta das bactérias, as quais liberam substâncias tóxicas aos espermatozoides (Althouse *et al.*, 2000), como é o exemplo da *Escherichia coli*, ou por eventos indiretos, como a alteração de pH do meio, devido aos metabólitos resultantes da proliferação bacteriana que podem acidificá-lo (Rideout *et al.*, 1982). Além disso, vale ressaltar, ainda, que as doses inseminantes são compostas por sêmen e diluente, que é rico em substratos como a glicose, que têm como função nutrir os espermatozoides. Em situações de alta contaminação bacteriana, as bactérias competem pelos substratos presentes na dose, resultando em uma redução da fonte de energia utilizada pelos espermatozoides (Rideout *et al.*, 1982), o que pode se intensificar em doses armazenadas sem antimicrobianos.

Emissões de vibração no transporte

Além dos desafios associados à taxa de resfriamento, é importante considerar que a consolidação da inseminação artificial levou à necessidade de otimização do uso dos reprodutores e a uma consequente centralização da produção de doses inseminantes em poucos centros (UDGs). Esse processo levou ao aumento do volume de doses sendo transportadas para as granjas e também à execução de trajetos de longas distâncias, visto que a produção está sendo concentrada em um volume menor de polos (Schulze *et al.*, 2018). Apesar dos benefícios gerados com a especialização de mão de obra e otimização de uso dos machos, essa centralização tem demonstrado um desafio significativo associado à manutenção da qualidade espermática durante o transporte.

O efeito negativo gerado pelo transporte das doses está associado com as condições das rodovias, aceleração e vibrações (Daponte *et al.*, 2013). De forma geral, o delineamento de estudos que avaliem o efeito do transporte, levam em consideração um limiar do desvio padrão de mensurações geradas em aparelhos celulares incorporados com acelerômetros para detecção de buracos, fissuras, colisões ou outras anormalidades de estradas (Lane *et al.*, 2010; Kalra *et al.*, 2014). Todavia, muita variação nesse tipo de abordagem é observada.

Pensando avaliar de forma precisa os efeitos negativos do transporte em doses inseminantes de sêmen suíno, Schulze *et al.* (2018) desenvolveram um estudo com o uso de aplicativo (Transport Log 1.0) desenvolvido especialmente para detectar as emissões de vibração geradas pelo transporte. Nesse estudo, doses armazenadas a 17 °C foram submetidas a emissões de vibrações (simulação do transporte de UDG até as granjas) e se observou que as emissões exerciam um efeito dependente da frequência na motilidade espermática de doses inseminantes de suínos. O efeito negativo foi observado em doses diluídas com BTS, submetidas às emissões de vibração horizontais e circulares durante 6 horas com frequência de 300 rpm.

Devido ao uso de um diluente pouco complexo (BTS), as emissões de vibração podem causar uma má regulação do pH, visto que o diluente apresenta um sistema tampão simples (JOHNSON *et al.*, 1982). Além disso, as emissões de vibração estão associadas com a perda de CO₂ da fase líquida para o ar presente nas doses, alcalinizando o meio de preservação (VYT *et al.*, 2007). Alguns estudos indicam que a alcalinização das doses inseminantes pode ser responsável pela perda de motilidade espermática (Gatti *et al.*, 1993; VYT *et al.*, 2007). Há ainda evidências de redução da atividade mitocondrial e integridade do acrossoma e membrana plasmática em doses submetidas à rotação e homogeneização durante o armazenamento (Schulze *et al.*, 2015; Menegat *et al.*, 2017). As emissões de vibração também podem aumentar o estresse oxidativo nos espermatozoides, levando à perda de motilidade ou alterações nas propriedades de membrana devido à força de cisalhamento gerada durante o transporte (Schulze *et al.*,



2018).

Levando em consideração essas informações, fica claro que as doses inseminantes armazenadas a 5 °C são submetidas a um primeiro desafio que é a taxa de resfriamento e armazenamento hipotérmico e a um segundo desafio, o transporte a longas distâncias. Em um estudo realizado com doses inseminantes submetidas a emissões de vibração, Paschoal *et al.* (2021) observaram que o sêmen diluído com BTS e Androstar® Plus, ambos contendo antimicrobianos e armazenados a 17°C, tiveram a motilidade e a viabilidade espermática prejudicadas ($P < 0.05$) quando na presença de emissões de vibração. Este fato ocorrendo ao comparar com doses que não sofreram as emissões de vibração. Além disso, foi observado que as doses armazenadas com Androstar® Plus tiveram melhor qualidade quando comparadas com as doses armazenadas com BTS. Esse resultado indica a importância do uso de diluentes com potencial protetivo aos espermatozoides. Nesse mesmo estudo, testou-se o efeito das emissões de vibração em doses sem antimicrobianos e armazenadas à 5 °C. A motilidade espermática, após 24 horas, foi reduzida ($P < 0,05$) em doses submetidas a emissões de vibração na temperatura de 22 °C, mas não nas armazenadas à 5 °C. Esse resultado indica que quando as doses são produzidas com diluente altamente protetivo (Androstar® Premium) e a curva de resfriamento utilizada é amena, os espermatozoides são mais resistentes aos efeitos negativos do transporte.

Logística

É importante considerar que tanto as centrais de inseminação artificial quanto as granjas nas quais se armazenam as doses antes de inseminação artificial das matrizes, são equipadas com conservadoras que mantêm as doses a uma temperatura de 15 a 17 °C. Pensando em equipamentos disponíveis no mercado, a aquisição de um resfriador capaz de manter a temperatura das doses a 5°C não é um desafio, no entanto, é necessário considerar o custo de aquisição do equipamento.

Importante ainda é considerar que a manutenção do ambiente dentro do automóvel de transporte pode ser regulada para uma temperatura próxima a 18°C. Para o transporte de doses resfriadas a 5°C seria necessária a aquisição de um refrigerador compacto compatível com a fonte de energia gerada nos automóveis para manutenção das doses à temperatura almejada. Esses fatores associados à logística também devem ser considerados quando pensamos no armazenamento a 5°C como uma estratégia substitutiva ao uso de antimicrobianos.

Considerações finais

Desenvolver estratégias promissoras, que visam substituir o uso de antimicrobianos, como é o caso do armazenamento a 5 °C, é imprescindível para reduzir a resistência gerada e/ou propagada pelas doses inseminantes. No entanto, avaliar os desafios associados ao uso dessa estratégia, assim como saná-los é um passo importante para a consolidação do uso do armazenamento a essa temperatura.

Referências

- Althouse G, Pierdon M, Lu KJ.** Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*. v.70, n.8, p.1317-1323, 2008.
- Althouse GC, Lu KGJT.** Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. v.63, n.2, p.573-584, 2005.
- Amann R, Graham JKJER.** Spermatozoa function. In: Mc Kinnon A. O.: VOSS, J L Equine Reproduction 1 ed. Philadelphia: Lea e Fibiger p.715-745, 1993.
- Bresciani C, Cabassi CS, Morini G, Taddei S, Bettini R, Bigliardi E, Ianni DF, Sabbioni A, Parmigiani E.** Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Ital J Anim Sci*. v.13, n.1, p.3082, 2014.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS.** Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* v. 1, n.3, p.224-238, 1994.
- Casas I, Althouse GJC.** The protective effect of a 17 C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 C. *Cryobiology* v.66, n.1, p.69-75, 2013.
- Daponte P, De Vito L, Picariello F, Riccio M.** State of the art and future developments of measurement applications on smartphones. *Measurement* v.46, n.9, p.3291-3307, 2013.
- Menezes TA, Mellagi APG, Oliveira GS, Bernardi M, Wentz I, Ulguim RR, Bortolozzo FP.** Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in-vitro



- sperm quality and reduces bacterial load. *Theriogenology* v.149, p.131-138, 2020.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* v.27, n.2, p.171-183, 1990.
- Gatti JL, Chevrier C, Paquignon M, Dacheux JL.** External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil.* v.98, n.2, p.439-449, 1993.
- Goldberg AM, Argenti LE, Faccin JE, Linck L, Santi M, Bernardi ML, Cardoso MR, WENTZ I, Bortolozzo FP.** Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res Vet Sci.* v.95, n.2, p.362-367, 2013.
- Jäkel H, Scheinflug K, Mühldorfer K, Gianluppi R, Lucca MS, Mellagi APG, Bortolozzo FP, Waberski D.** In vitro performance and in vivo fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5° C. *J Anim Sci Biotechnol.* v.12, n.1, p.1-12, 2021.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM.** Storage of boar semen. *Anim Rep Sci,* v.62, n.1-3, p.143-172, 2000.
- Johnson LA, Aalbers JG, Willems CM, Rademaker JH, Rexroad CEJR.** Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18° C. *J Anim Sci.* v.54, n.1, p.132-136, 1982.
- Kalra N, Chugh G, Bansal D.** Analyzing driving and road events via smartphone. *Int. J Comput Appl* v. 8, n.12, p.5-9, 2014.
- katzer LH, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I.** Viability of swine semen stored at 5° C according to the cooling rate and previous incubation. *Reprod Anim.* v.35, n.1, p.138-144, 2005.
- Lane ND, Miluzzo E, Lu H, Peebles D, Choudhury T, Campbell AT.** A survey of mobile phone sensing. *Ad Hoc Netw.* v.48, n.9, p.140-150, 2010.
- López Rodríguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A, Maes D.** Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reprod Domest Anim,* v.6, p.63. 2012.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, De Kruif A, Van Soom A.** Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* v.70, n.8, p.1337-1345, 2008.
- Menegat MB, Mellagi APG, Bortolin RC, Menezes TA, Vargas AR, Bernardi ML, Went I, Gelain DP, Moreira JCF, Bortolozzo FP.** Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short-and long-term extenders. *Anim Reprod Sci,* v.179, p.67-79, 2017.
- Parks JE, Graham JKJT.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- Paschoal AFL, Luther AM, Jäkel H, Scheinflug K, Mühldorfer K, Bortolozzo FP, Waberski D.** Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5° C. *Plos Onev.* 15, n.6, p.e0234339, 2020.
- Paschoal AFL, Luther AM, Jakop U, Schulze M, Bortolozzo FP, Waberski D.** Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen. *Theriogenology* v.175, p.54-60. 2021.
- Paschoal A FL, Mellagi APG, Ferrari CV, Takeuti KL, Oliveira GS, Bernardi ML, Ulguim RR, Bortolozzo FP.** Adjusted method of penis fixation during boar semi-automatic semen collection aiming to reduce bacterial contamination. *Reprod Domest Anim.* v.56, n.6, p.897-904, 2021.
- Purdy PH.** The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci.* v.93, n.1-2, p.114-123, 2006.
- Rideout MI, Burns SJ, Simpson RB.** Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* v.32, p.35-40, 1982.
- Schulze M, Henning H, Rüdiger K, Wallner U, Waberski D.** Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology* v.80, n.9, p.990-998, 2013.
- Schulze M, Ammon C, Rüdiger K, Jung M, Grobbel M.** Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology.* v.83, n.3, p.430-437, 2015a.
- Schulze M, Bortfeldt R, Schäfer J, Jung M, Fuchs-Kittowski F.** Effect of vibration emissions during shipping of artificial insemination doses on boar semen quality. *Anim Reprod Sci* v.192, p.328-334, 2018.
- Steverink D, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B.** Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation results in sows. *Anim Reprod Sci.* v.54, n.2, p.109-119, 1998
- Vyt P, Maes D, Sys SU, Rijsselaere T, Van Soom, A.** Air contact influences the pH of extended porcine semen. *Reprod Domest Anim.,* v.42, n.2, p.218-220, 2007.



Waberski D, Luther AM, Grünther B, Jäkel H, Henning H, Vogel C, Peralta W, Weitze KF. Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. v.9, n.1, p.1-10, 2019.

Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim.* v.31, n.1, p.135-140, 1995

Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reprod Domest Anim.* v.50, p.71-79, 2015.
