

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA FACULDADE DE  
MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**THAIS SCHWARZ GAGGINI**

**PRESENÇA DA GOTA CITOPLASMÁTICA E SEUS EFEITOS  
NA MORFOMETRIA, CROMATINA E  
MOTILIDADE ESPERMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
CANDIDATOS À SELEÇÃO DE PARÂMETROS SEMINAIS DE  
SUÍNOS**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

THAIS SCHWARZ GAGGINI

**PRESENÇA DA GOTA CITOPLASMÁTICA E SEUS EFEITOS  
NA MORFOMETRIA, CROMATINA E  
MOTILIDADE ESPERMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
CANDIDATOS À SELEÇÃO DE PARÂMETROS SEMINAIS DE  
SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação da Faculdade de Medicina  
Veterinária – UFU, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Robson Carlos  
Antunes

Coorientadora: Profa. Fernanda Marcondes  
de Rezende

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G133p  
2017      Gaggini, Thais Schwarz, 1986  
Presença da gota citoplasmática e seus efeitos na morfometria, cromatina e motilidade espermática e identificação de genes candidatos à seleção de parâmetros seminais de suínos / Thais Schwarz Gaggini. - 2017.

134 p. : il.

Orientador: Robson Carlos Antunes.

Coorientadora: Fernanda Marcondes de Rezende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Suíno - Reprodução - Teses. 3. Cromatina - Teses. 4. Espermatozoides - Teses. I. Antunes, Robson Carlos, 1968-. II. Rezende, Fernanda Marcondes de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

---

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**THAIS SCHWARZ GAGGINI** – nascida em 23 de maio de 1986, em São Bernardo do Campo – SP. Em julho de 2010 concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). De julho de 2010 a fevereiro de 2011 foi bolsista de Apoio Técnico do Setor de Suínos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), supervisionada pelo Prof. Dr. David Barcellos e, em março de 2011 iniciou o programa de mestrado em Ciências Veterinárias na mesma instituição, orientada pelo Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo e coorientada pelo Prof. Dr. Ivo Wentz. De julho a outubro de 2012 realizou intercâmbio no Topigs Research Center IPG – Beuningen - Holanda, sob supervisão da Dra. Hanneke Feitsma. Em março de 2013 concluiu o mestrado e mudou-se para Uberlândia – MG para trabalhar na empresa BRF como Médica Veterinária responsável pelo Centro de Difusão Genética e Assistente Técnica de Unidades Produtoras de Leitores e de Matrizes. Em março de 2014 iniciou o doutorado pela Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. Robson Carlos Antunes e coorientação da Profa. Dra. Fernanda Marcondes de Rezende. De dezembro de 2014 a fevereiro de 2016, concomitantemente ao doutorado, trabalhou como Especialista Técnica em Aves e Suínos na empresa Ourofino Saúde Animal. De setembro a outubro de 2015 visitou a empresa Hypor Inc., em Regina – Saskatchewan – Canadá, como parte da realização do projeto de doutorado. De fevereiro de 2016 a julho de 2016 foi professora da disciplina Doenças de Suínos na Faculdade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC – Uberlândia) e também foi professora dos cursos de MBA em Produção de Suínos das empresas Didatus (Junho 2016 - São Gabriel do Oeste – MS) e Uniguaçu (Setembro 2016 e Junho 2017 - União da Vitória – PR). Atualmente reside em Cascavel – PR, onde é participante da Associação de Veterinários Especialistas em Suínos – PR e professora no Centro Universitário Dinâmica das Cataratas (UDC), em Foz do Iguaçu - PR.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a essa força maior que rege o mundo por sempre manter o universo conspirando a nosso favor. Agradeço por ter tantas pessoas a minha volta que me ajudam e me amparam sempre que necessito. Dedico este trabalho a todas elas.

À minha mãe, Lídia, e meus irmãos, Fernando e Eduardo, agradeço por tudo... Obrigada pelo amor, apoio e carinho sempre.

Às minhas cunhadas queridas, por cuidarem muito bem dos meus irmãos e serem tão amigas e apoiadoras!

Ao meu sobrinho Henrique, por amar a tia e os “porquinhos” e o mais novo integrante da família, Rafael, que já enche de alegria a família, mesmo na barriga da mamãe Cíntia.

Ao Faraó e ao Duque, *in memoriam*, por mostrarem o quanto os animais são especiais em nossas vidas.

À minha nova família, Mara, Paulo, Matheus, Elisa e todos os Salomão e Moura, pelo carinho e apoio.

Às minhas amigas de infância, aos amigos de faculdade, do mestrado e do mundo, agradeço por sempre estarem próximos. Em especial agradeço à Maria Clara, João, Fabinho, Fabrina, Renato, Laine, Manoela e ao Thominhas que tornaram meus dias em Uberlândia mais felizes.

À Célia Gonçalves por me ajudar a entrar nos eixos!

Aos amigos da BRF, agradeço o apoio, a amizade e o aprendizado. Em especial agradeço ao Paulo Lesskiu, Daniele de Lima, a equipe do SPL e SVT e a “eterna” e querida equipe SPM, principalmente ao César, Daniela, Heloiza, Janaina e Grazi.

Aos amigos da Ourofino, em especial agradeço ao Amilton, Marcus, Andrea, Juliana e a todos com quem pude conviver e aprender. Andrea, Marco, Daniel e Carol vocês foram muito especiais nesse período da minha vida e agradeço imensamente por transformar a casa de vocês na minha casa de Ribeirão Preto! Alê e Bia bem-vindos ao grupo que vai para Barretos!

Aos colegas de UNIPAC e da UDC e aos alunos das disciplinas pela possibilidade de um novo aprendizado.

Ao meu orientador, prof. Robson, agradeço imensamente o apoio, a compreensão e os ensinamentos.

À minha coorientadora, profa. Fernanda, agradeço a motivação, a imensa ajuda e a alegria. Trabalhar com você foi um imenso prazer!

A todos do Laboratório de Histologia da UFU pelo auxílio, incluindo o prof. Marcelo Beletti, que me cedeu espaço no laboratório, que foi sempre tão gentil e acessível e foi parte fundamental para a realização do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação da UFU, à Célia e a todos os professores que ministraram aulas, especialmente ao Prof. Evandro, com quem tive muitas discussões agradáveis sobre nutrição de monogástricos e sobre a vida! Também agradeço a professora Ana Luísa que me deu muito apoio nesta etapa.

Aos professores da Faculdade de Matemática, principalmente o prof. Ednaldo e a profa. Maria Imaculada, que permitiram que eu frequentasse ativamente o Departamento de Estatística e participasse das aulas de Estatística Computacional.

Ao Elisson e a Lays, por todo o auxílio e paciência, sendo imprescindíveis para a realização do primeiro projeto.

À Helomar, ao Patrick, ao Luis, à Diana, ao Ramon e a todos da Hypor que colaboraram com os projetos. Agradeço a acessibilidade e terem permitido que eu visitasse as instalações da empresa. Em especial, agradeço à Helomar e ao Robert pelo bom humor, o carinho e por terem me recebido tão bem em Regina!

Aos professores da UFRGS, que sempre permaneceram presentes no meu aprendizado. Em especial agradeço aos amigos Ana Paula Mellagi e Fernando Bortolozzo pelo apoio e discussão sobre ideias, projetos e dados.

Aos membros da banca e suplentes, Profa. Adriana Santana do Carmo, Profa. Ana Luísa Neves Alvarenga Dias, Profa. Ana Paula Gonçalves Mellagi, Dr. Diego Vilela Alkmin, Prof. Marcelo Emílio Beletti e Prof. José Octavio Jacomini por se disponibilizarem a corrigir e avaliar este trabalho.

Quanto ao Tiago, não existe palavra no mundo que possa traduzir o que sinto. Agradeço pela ajuda, por todo o amor, dedicação, apoio, conversas, abraços... enfim, agradeço por você existir e ter me escolhido para viver ao seu lado por toda nossa vida!

Gaggini, Thais Schwarz, 2017. Presença da gota citoplasmática e seus efeitos na morfometria, cromatina e motilidade espermática e identificação de genes candidatos à seleção de parâmetros seminais de suínos. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias. UFU. Uberlândia, MG.

## **RESUMO**

O principal desafio do desempenho reprodutivo de machos suínos está relacionado a duas grandes frentes de estudo que englobam a qualidade do ejaculado/doses inseminantes e fertilidade dos reprodutores. A fim de elucidar alguns pontos relacionados a estas frentes de estudo, foram realizadas três pesquisas com o objetivo de a) verificar se a presença de gota citoplasmática está associada a características morfométricas e a cromatina espermática; b) verificar se a reprovação de ejaculados devido à alta ocorrência de gota citoplasmática distal interfere em parâmetros relacionados ao movimento espermático e; c) averiguar se há correlação entre parâmetros seminais com marcadores genéticos específicos em reprodutores. No primeiro estudo, foram avaliados 1 207 espermatozoides normais e 725 com presença de gota citoplasmática em relação à morfometria da cabeça e a estabilidade da cromatina espermática. As cabeças dos espermatozoides do grupo com gota citoplasmática apresentaram-se mais alongadas, simétricas lateralmente, com maior porcentagem de descompactação e maior heterogeneidade da cromatina do que células sem alteração morfológica. Isto indica que alterações morfológicas que não ocorrem diretamente na cabeça do espermatozoide estão associadas com características da conformação da cabeça e da estrutura do material genético da célula. No segundo estudo, foi realizada a comparação de parâmetros relacionados ao movimento espermático em ejaculados considerados aprovados (n=144) e reprovados (n=25) exclusivamente por terem alta ocorrência de gota citoplasmática distal no exame morfológico. O grupo reprovado apresentou espermatozoides com menor velocidade em linha reta, menor motilidade total e progressiva quando comparado ao grupo aprovado no exame morfológico. A reprovação por gota citoplasmática distal, que para diversos autores é considerada sem significado patológico, influenciou negativamente os parâmetros relacionados ao movimento espermático,



o que sugere que a reprovação, por esta causa, passe a ser considerada nas avaliações de morfologia espermática. Na terceira pesquisa, foi realizado um estudo de associação de regiões genômicas com os parâmetros volume do ejaculado, concentração espermática, motilidade total e progressiva do espermatozoide, utilizando 113 reprodutores suínos da raça Duroc genotipados pelo Illumina PorcineSNP60 BeadChip. Um total de 57 janelas de SNPs (polimorfismo de nucleotídeos únicos) que explicaram mais de 1% de variância genética aditiva foram identificadas para volume (22), concentração (14), motilidade total (10) e progressiva (11). Treze genes de oito janelas de SNPs foram considerados candidatos para as características estudadas. O gene *ABCC3* foi relacionado ao volume do ejaculado, os genes *KCNA3*, *RBM15* e *ITGB1* à concentração espermática, o gene *WRNIP1* à motilidade total, os genes *FAM189A2*, *C9orf135*, *FXN* e *FAM83D* à motilidade progressiva e os genes *HSD17B11* e *HSD17B13* à motilidade total e progressiva. A identificação de possíveis genes candidatos para as diferentes características seminais de reprodutores pode contribuir para a evolução do conhecimento da base genética de suínos e ainda aperfeiçoar o processo de seleção de animais a serem utilizados em Centrais de Inseminação Artificial.

**Palavras-chave:** avaliações seminais, cromatina, GWAS, macho suíno, morfometria espermática.

Gaggini, Thais Schwarz, 2017. Presence of cytoplasmic droplet and its effects on sperm morphometry, chromatin and motility and identification of candidate genes for selection of boars' seminal parameters. Doctoral thesis in Veterinary Sciences. UFU. Uberlândia, MG.

## **ABSTRACT**

The main challenge of boars' reproductive performance is related with two major lines of study that include the quality of the ejaculate/inseminating doses and boars fertility. In order to elucidate some points related to these lines, three studies were carried out with the aim of a) verify if the cytoplasmic droplet presence in sperm is associated with morphometric and chromatin characteristics; b) verify if reprobation of ejaculates due to high occurrence of distal cytoplasmic droplets interferes in spermatoc movement parameters; c) investigate if there is a correlation among seminal parameters with specific genetic markers in boars. In the first study, 1,207 normal sperm and 725 sperm with cytoplasmic droplet were evaluated in relation to head morphometry and chromatin stability. Heads of sperm with cytoplasmic droplets were more elongated, laterally symmetrical, had higher percentage of decondensed chromatin and more heterogeneous chromatin than heads of normal sperm. These results indicate that morphological changes that do not occur directly on sperm head are associated with the conformation of the head and the structure of cell genetic material. In the second study it was compared parameters related to sperm movement in ejaculates considered approved (n=144) and rejected (n=25) exclusively due the high occurrence of distal cytoplasmic droplets on morphological exam. Sperm of rejected group presented lower velocity straight line, lower total and progressive motility than sperm of approved group. The reprobation due distal cytoplasmic droplet, which by several authors is considered without pathological significance, had a negative influence on sperm motion parameters. It suggests that reprobation for this cause should be considered in sperm morphology assessments. In the third research, a genome-wide association study was performed with ejaculate volume, sperm concentration

and total and progressive sperm motility, using 113 Duroc boars genotyped by Illumina PorcineSNP60 BeadChip. A total of 57 SNPs (single nucleotide polymorphism) windows that explained more than 1% of genetic variance were identified for ejaculate volume (22), sperm concentration (14), total (10) and progressive (11) motility. Thirteen genes of eight SNPs windows were considered candidates for those characteristics. Gene *ABCC3* was related to volume, genes *KCNA3*, *RBM15* and *ITGB1* to sperm concentration, gene *WRNIP1* to total motility, genes *FAM189A2*, *C9orf135*, *FXN* and *FAM83D* to progressive motility and genes *HSD17B11* and *HSD17B13* to total and progressive motility. The identification of possible candidate genes for the different seminal characteristics of boars can contribute to knowledge of the genetic background of swine production and also to improve the selection process of boars to be used in boar studs.

**Key-words:** boar, chromatin, GWAS, sperm evaluations, sperm morphometry.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>                                                                                                         | <b>12</b>  |
| 1. Introdução                                                                                                                                    | 13         |
| 2. Objetivo                                                                                                                                      | 14         |
| 2.1. Objetivo Geral                                                                                                                              | 14         |
| 2.2 Objetivos Específicos                                                                                                                        | 15         |
| 3. Revisão de literatura                                                                                                                         | 15         |
| 3.1 Qualidade do ejaculado, dos espermatozoides e das doses inseminantes                                                                         | 15         |
| 3.1.1 Influência dos componentes do plasma seminal na qualidade espermática e fertilidade                                                        | 16         |
| 3.1.2 Métodos de avaliação do ejaculado e dos espermatozoides                                                                                    | 18         |
| 3.1.3 Efeito da diluição e do processamento do ejaculado e do armazenamento das doses inseminantes                                               | 30         |
| 3.1.4 Criopreservação do ejaculado suíno                                                                                                         | 34         |
| 3.2 Fatores genéticos relacionados ao desempenho reprodutivo do macho suíno                                                                      | 35         |
| 3.2.1 Identificação de genes por meio de marcadores moleculares                                                                                  | 36         |
| 3.2.2 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP)                                                                                                    | 36         |
| 3.2.3 Estudo Amplo de Associação Genômica (GWAS)                                                                                                 | 37         |
| 3.2.4 Resultados obtidos com GWAS em suínos                                                                                                      | 37         |
| <b>CAPÍTULO 2 - Head morphometry and chromatin instability in normal boar sperm and in sperm with cytoplasmic droplets</b>                       | <b>68</b>  |
| <b>CAPÍTULO 3 - Alta ocorrência de gota citoplasmática distal altera parâmetros relacionados ao movimento espermático de reprodutores suínos</b> | <b>89</b>  |
| <b>CAPÍTULO 4 – Genome-wide association study and novel identification of candidate genes for sperm traits in Duroc boars</b>                    | <b>103</b> |

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. Introdução

Ao longo dos anos a suinocultura tecnificada vem se aprimorando por meio de novas tecnologias e métodos de manejo dos animais. Esse aprimoramento visa obter melhores resultados produtivos e alcançar as exigências que o mercado impõe, sendo estas mais complexas a cada dia. A inseminação artificial (IA) é uma das tecnologias que se consagraram e vem sendo utilizada há décadas na produção (BORTOLOZZO et al. 2005a; ROCA et al. 2006; FÁVERO & FIGUEIREDO, 2009).

Diversas vantagens são observadas após introduzir a IA no rebanho, estando entre elas à redução nos custos por fêmea inseminada e o melhor aproveitamento das instalações (BORTOLOZZO et al. 2005a). No entanto, além de contribuir na redução de gastos, o maior benefício da IA está relacionado à aceleração do melhoramento genético (FOXCROFT et al. 2010), devido à possibilidade de expressão do melhor potencial genético dos machos utilizados (ROCA et al. 2011), acarretando com isso, melhorias nas características de produtivas dos seus descendentes (FÁVERO & FIGUEIREDO, 2009).

Com a utilização da IA, a proporção do número de machos utilizados em relação ao plantel de fêmeas atendidas diminuiu significativamente quando comparado à monta natural (BORTOLOZZO et al. 2005a). Na monta natural, um macho tem capacidade de cobrir uma a três fêmeas por semana. Já, quando se utiliza a IA tradicional (cervical) - considerando um animal que produza uma média de 75 bilhões de espermatozoides por ejaculado - pode-se inseminar aproximadamente 25 a 60 fêmeas por semana, dependendo da quantidade de espermatozoides utilizada na dose inseminante (DI) e do número de coletas por semana que o macho tolera.

A diminuição do número de machos no plantel possibilitou a criação de centrais de inseminação artificial (CIAs), que têm como o principal propósito promover a distribuição de genética de alta qualidade, tornando os programas de melhoramento genético mais eficientes (BROEKHUIJSE et al. 2012). No entanto,

isto só se torna possível com o uso de DIs de qualidade, produzidas a partir do sêmen de reprodutores suínos férteis e geneticamente superiores.

Atualmente, o principal desafio do desempenho reprodutivo de machos suínos está relacionado a duas grandes linhas de estudo que englobam a qualidade do ejaculado/DIs e a característica genética dos reprodutores ligada à fertilidade. Na primeira linha de estudo, tem-se discutido a influência dos componentes do plasma seminal sobre a qualidade espermática e fertilidade (HENAULT & KILLIAN, 1996; BELIBASAKI et al. 2000; DICK et al. 2011), a realização de diferentes análises dos espermatozoides na rotina das CIAs (GADEA, 2005; BOE-HANSEN et al. 2008; OH et al. 2010; WABERSKI et al. 2011; CORCINI et al. 2011), o aprimoramento de técnicas já estabelecidas na realização de testes com o ejaculado (BROEKHUIJSE et al. 2011; FEITSMA et al. 2011) e o efeito da diluição, do processamento, do armazenamento e da criopreservação do ejaculado sobre a fertilidade (FLOWERS, 1996; BOE-HANSEN et al. 2008; MARTÍN-HIDALGO et al. 2011; YESTE, 2015). Na segunda linha de estudo, busca-se correlacionar características fenotípicas relacionadas à qualidade espermática com marcadores genéticos específicos (XING et al. 2009; GUNAWAN et al. 2012; DINIZ et al. 2014; ZHAO et al. 2016).

## **2. Objetivo**

### **2.1. Objetivo Geral**

A fim de elucidar alguns pontos relacionados às linhas de estudo citadas anteriormente, o presente estudo buscou relacionar as avaliações morfológicas do sêmen com as avaliações morfométricas da cabeça dos espermatozoides, de cromatina espermática e de parâmetros relacionados ao movimento espermático. Além de identificar genes candidatos que possam influenciar os parâmetros seminais de reprodutores suínos.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1 Verificar se a presença das gotas citoplasmáticas distal e proximal altera parâmetros morfométricos da cabeça do espermatozoide e a estabilidade da cromatina espermática;
- 2.2.2 Verificar se a alta ocorrência de gota citoplasmática distal no ejaculado altera parâmetros relacionados ao movimento da célula espermática;
- 2.2.3 Verificar possíveis genes candidatos que possam influenciar no volume e concentração do ejaculado e na motilidade total e progressiva dos espermatozoides.

## **3. Revisão de literatura**

### **3.1 Qualidade do ejaculado, dos espermatozoides e das doses inseminantes**

As CIAs têm como objetivo principal garantir a qualidade das DIs utilizadas, de forma que apenas ejaculados considerados aprovados em testes específicos sejam utilizados no processamento. Essa ação impacta diretamente nos índices zootécnicos da granja, pois a qualidade do ejaculado e das DIs está relacionada à variação dos índices relacionados à fertilidade de suínos (FLOWERS, 1996; FLOWERS, 1997). Nesse sentido, a discussão a respeito dos componentes do ejaculado, seus métodos de avaliação e sua forma de processamento é necessária para que sejam entendidas quais as atividades e qual a influência das ações da CIA dentro de um sistema de produção.



### 3.1.1 Influência dos componentes do plasma seminal na qualidade espermática e fertilidade

Na espécie suína, o ejaculado é caracterizado por conter pequena densidade de células espermáticas e grandes volumes de secreções provenientes dos epidídimos e glândulas acessórias, que formam o plasma seminal (DAVIES et al. 1975). Este é composto basicamente por proteínas, enzimas, carboidratos, ácidos, íons, minerais, hormônios e fatores imunológicos (MATOUSÍEK, 1985; BEDWAL & BAHUGUNA, 1995; SOUZA et al. 1999; CHIA et al. 2000) e, o arranjo dessas substâncias pode variar entre espécies, entre indivíduos da mesma espécie e inclusive entre ejaculados do mesmo animal (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011).

Por muito tempo pesquisas relacionadas ao plasma seminal eram pouco realizadas, pois este era considerado apenas um veículo de transporte dos espermatozoides, sendo em algumas situações, considerado deletério para a longevidade das células espermáticas (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2008). No entanto, nos últimos anos, resultados de diversos estudos demonstraram que o plasma seminal possui outras funções de importância para a reprodução (O'LEARY et al. 2004; SELIGMAN et al. 2005; TROEDSSON et al. 2005; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2008; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2010; BJÖRND AHL & KVIST, 2010; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011) e este passou a ser objeto de trabalho de diferentes grupos de pesquisa.

Em sua grande maioria, os estudos relacionados ao efeito do plasma seminal na fertilidade buscam explicações voltadas às proteínas que o compõe. Uma das proteínas mais estudadas é a família das espermadesinas (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998), que engloba a proteína alanina-glutamina-asparagina 1 e 3 (AQN-1 e AQN-3), a proteína alanina-triptofano-asparagina (AWN), que juntas são conhecidas como proteínas de ligação à heparina (HBP), além das proteínas do plasma seminal suíno I e II (PSP-I e PSP-II) (CABALLERO et al. 2008; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2011). De forma geral, as HBP estão principalmente relacionadas com a estabilização de membrana, à capacitação

espermática e à ação entre o espermatozoide e o tuba uterina/zona pelúcida (CALVETE et al. 1997), sendo a AWN mais relacionada com a inibição da capacitação espermática (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1998; DAPINO et al. 2009; VADNAIS & ROBERTS, 2010) e a AQN-3 com a ligação entre o espermatozoide e a zona pelúcida (VAN GESTEL et al. 2007). As PSP atuam prevenindo a capacitação precoce do espermatozoide, permitindo que este alcance a tuba uterina estando funcionalmente competente (CABALLERO et al. 2009).

Outras proteínas do plasma seminal também foram identificadas como tendo importante papel na reprodução de suínos, como a pB1 (CALVETE & SANZ, 2007) e as proteínas secretória ricas em cisteína tipo 1, 2 e 3 (CRISP1, 2 e 3) (VADNAIS et al. 2008; KOPPERS et al. 2011). A pB1 foi relacionada à capacitação do espermatozoide (LUSIGNAN et al. 2007) e as CRISPs foram identificadas desde os estágios iniciais da espermatogênese até o processo de fertilização, porém, não sendo clara a função exata destas (GIESE et al. 2002; BUSSO et al. 2005; KOPPERS et al. 2011).

Apesar de serem escassos, os resultados de pesquisas a respeito de minerais e íons no plasma seminal têm demonstrado a relevância destes componentes na manutenção da viabilidade e função das células espermáticas. O zinco e o selênio, que possuem ação antioxidante, foram associados à qualidade seminal em humanos (BEDWAL & BAHUGUNA 1994; CHIA et al. 2000; GAVELLA et al. 2000; POWELL, 2000; BJORND AHL & KVIST 2010;) e a baixa quantidade de zinco no ejaculado foi correlacionada à infertilidade (CHIA et al. 2000; COLAGAR et al. 2009). O fornecimento de dietas com diferentes níveis de minerais mostrou ter efeito sobre a concentração de íons no plasma seminal (CEVIK et al. 2007). Quando inadequada, a concentração de íons interfere no metabolismo celular, alterando a motilidade espermática (KAYA et al. 2002; MASSÁNYI et al. 2003; JOBIM et al. 2005), aumentando a ocorrência de alterações morfológicas (ASSUMPÇÃO et al. 2005) e interferindo na composição de enzimas (CEVIK et al. 2007). Dessa forma, mesmo indiretamente, a alteração na concentração e proporção de íons interfere na qualidade seminal, pois

diferentes enzimas participam dos processos metabólicos durante a maturação da célula espermática e influenciam na qualidade do ejaculado (KING & MACPHERSON 1966; KOHDAIRA et al. 1986; CHIKHI et al. 1999; SELIGMAN et al. 2005).

Diversos hormônios e citocinas compõem o plasma seminal e esta composição varia entre espécies (JUYENA & STELLETTA, 2012) e, em alguns casos, entre frações do ejaculado (SESHADRI et al. 2009; JIWAKANON & DALIN, 2012). As funções específicas destes não são claras, mas alguns estudos com outras espécies indicam que estes componentes exercem um efeito imunorregulatório que auxilia na manutenção e sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino (QIAN et al. 2011; JUYENA & STELLETTA, 2012; SHARKEY et al. 2012). Estudos com suínos são pouco comuns e não se sabe ao certo quais são os hormônios componentes do plasma seminal. Dentre as citocinas, apenas algumas foram identificadas (Fator de Crescimento Transformador B 1 e 2, Interferon C e Interleucinas 6 e 10). Porém, nos estudos foi observada uma variação entre ejaculados, não permitindo saber ao certo qual o padrão para a espécie (O'LEARY et al. 2011; JIWAKANON & DALIN, 2012).

### 3.1.2 Métodos de avaliação do ejaculado e dos espermatozoides

Apesar de serem de extrema importância para a avaliação do ejaculado, e, conseqüentemente, para a manutenção de índices produtivos nas granjas (FLOWERS, 1996; FLOWERS, 1997), estas continuam sendo as mesmas utilizadas há décadas. Mesmo havendo evolução da avaliação do ejaculado e de reprodutores nos últimos tempos, ainda existe um *gap* entre o desenvolvimento de tecnologia para CIAs, quando comparado ao que se desenvolveu no manejo com fêmeas (SUTOVISKY, 2015). Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados, buscando novos métodos de avaliação do ejaculado e dos machos, de forma que novas técnicas de avaliação possam gerar a detecção de DI's com maior qualidade seminal e, com isso, melhores resultados produtivos na cadeia suinícola sejam obtidos.

## Métodos de avaliação do ejaculado utilizado na rotina de CIAs

Para que seja utilizado no processamento de DIs, os ejaculados precisam ser aprovados em diversas análises realizadas na rotina da CIA. As análises básicas comumente realizadas são as macroscópicas, que consistem na mensuração do volume, temperatura, avaliação de cor, odor, aspecto e; as microscópicas, que englobam as avaliações de motilidade, concentração e morfologia espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; FOXCROFT et al. 2008).

### Avaliações macroscópicas

Os primeiros procedimentos a serem realizados após a coleta são a mensuração da temperatura e do volume do ejaculado. Considerando o efeito deletério da ocorrência de choque térmico no ejaculado (WEITZE, 2012), a mensuração da temperatura é de grande importância para que os materiais e o diluente a ser misturado sejam mantidos na mesma temperatura (32° C) ou com variação mínima ( $\pm 1^\circ$  C) em relação ao ejaculado (BORTOLOZZO et al. 2005b).

O volume do ejaculado é estimado utilizando balança calibrada, considerando que cada grama de sêmen corresponde a 1 mL (BORTOLOZZO et al. 2005b). A determinação do volume do ejaculado é necessária para a realização do cálculo do número de DIs, após a aprovação em todos os testes e obtenção da concentração e motilidade espermática. A média de volume do ejaculado pode variar de acordo com linhagem genética, com a idade do animal, ou ainda com a frequência de coleta semanal praticada na CIA, porém a média de volume de um ejaculado suíno é de aproximadamente 200 a 250 mL (SENGER, 2003).

As avaliações de cor e odor têm importância relacionada com a identificação da contaminação do ejaculado. A cor natural do ejaculado suíno pode ter variações individuais, apresentando-se entre o branco, branco-acinzentado e o amarelo claro. No entanto, no caso de contaminação com urina ou sangue, a

coloração pode variar entre amarelo escuro ou rosada, respectivamente (STRZEŽEK et al. 1995; AGARWAL et al. 2003). Da mesma forma, o odor do ejaculado é *sui generis* e, quando contaminado, apresenta odor alterado, podendo ser fétido ou característico de urina. Nos casos de alteração de cor e odor, o ejaculado deve ser descartado sem necessidade de realização de avaliações microscópicas.

Nas espécies de ejaculação vaginal, como os ruminantes, pode-se mensurar a concentração espermática por meio da avaliação do aspecto do ejaculado. Porém, esse não é o caso dos suínos, que possuem ejaculação cervical e, por este motivo, apresentam grande quantidade de plasma seminal e menor concentração espermática (DAVIES et al. 1975; BORTOLOZZO et al. 2005b). Dessa forma, a avaliação do aspecto tem como função apenas a verificação subjetiva da diluição do ejaculado, podendo os ejaculados serem classificados como aquosos, soro-leitosos ou leitosos (SCHEID, 1993). Ejaculados muito diluídos não são considerados adequados para o processamento, porém, deve-se associar os resultados desta avaliação com a determinação da concentração espermática.

#### Avaliações microscópicas

Por estimar a viabilidade e o percentual de células móveis, a motilidade espermática é uma avaliação de extrema importância para a aprovação do ejaculado (BERNARDI, 2008; FOXCROFT et al. 2008; BROEKHUIJSE et al. 2011). Dentre as avaliações microscópicas, esta deve ser a primeira a ser realizada no ejaculado *in natura* (FLOWERS, 1997) e, se aprovada, deve ser repetida após a diluição, como forma de confirmação de que o processamento não alterou a viabilidade dos espermatozoides. Esta análise também pode ser utilizada como ferramenta para monitoramento das DIs, ao longo dos dias de armazenamento em conservadora de sêmen (BORTOLOZZO et al. 2005b).

Quando desenvolvida, a metodologia de avaliação da motilidade espermática tinha como característica ser estimada de forma subjetiva,

dependendo exclusivamente da observação de células móveis por campo, pelos técnicos de laboratório das CIAs (BROEKHUIJSE, 2012). No entanto, nas décadas de 1970 - 1980, sistemas computadorizados de análise do sêmen (do inglês *computer assisted sperm analysis* - CASA) passaram a ser comercializados e, a partir de 1993, estudos utilizando este sistema para diferentes espécies passaram a ser desenvolvidos e publicados (DAVIS & KATIS, 1993; BROEKHUIJSE, 2012; AMANN & WABERSKI, 2014). No Brasil, o CASA passou a ser comercializado a partir de 2010, visando CIAs de suínos (DADOS PESSOAIS), porém, por ter alto custo (BROEKHUIJSE, 2012), é utilizado apenas em CIAs que produzem grande quantidade de doses.

Basicamente, o sistema CASA visualiza e digitaliza a imagem do espermatozoide em movimento e determina a trajetória exata de cada célula. As informações coletadas são gravadas e cálculos são realizados, resultando em diferentes parâmetros disponibilizados pelo *software*, sendo esta uma análise considerada objetiva. Além da porcentagem de células móveis totais, o sistema CASA fornece a porcentagem de células que se deslocam progressivamente, a velocidade curvilínea (VCL), que corresponde à trajetória real da célula, a amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), a amplitude do deslocamento lateral da cabeça em relação à trajetória média (BCF), a distância da trajetória média percorrida (DAP), a distância curvilínea (DCL), a distância em linha reta (DSL), retilinearidade (LIN), a linearidade da trajetória (STR), a velocidade média percorrida (VAP), a velocidade em linha reta (VSL) e o coeficiente de oscilação (WOB).

Apesar da grande quantidade de variáveis obtidas pelo sistema CASA, ainda não se sabe ao certo qual é a influência destas na fecundação (DIDION, 2008) e, por este motivo, o parâmetro de motilidade total ainda é o considerado para a avaliação do ejaculado, tanto em testes subjetivos quanto objetivos. Para ambos os métodos de avaliação, o ponto de corte para a aprovação do ejaculado *in natura* e pós-diluído é de 70% de células móveis (FLOWERS, 1997), não devendo haver diferença maior do que 10% entre avaliações pré e pós-diluição (FLOWERS, 1997; RUIZ-SÁNCHEZ et al. 2006).

Após a aprovação no exame de motilidade, o ejaculado é submetido à determinação da concentração espermática, que visa quantificar o número de espermatozoides existentes. Quanto maior a acurácia e a precisão da técnica utilizada, mais confiável será a determinação do número de DIs possíveis de serem produzidas e o número de células presente em cada DI (HANSEN et al. 2002; CHRISTENSEN et al. 2004).

O número de células de um ejaculado pode ser estimado pelo uso de espermodensímetro, por meio da técnica de contagem de células em câmara hemocitométrica, pelo uso de espectofotômetro ou, ainda, utilizando o sistema CASA (BORTOLOZZO et al. 2005a; BROEKHUIJSE, 2012). A determinação da concentração utilizando espermodensímetro é indicada apenas para CIAs com baixa produção e que possuem mão-de-obra limitada, pois, apesar de rápido, o resultado obtido tem baixa confiabilidade e é baseado na leitura da turbidez do sêmen diluído em solução salina (BORTOLOZZO et al. 2008). O método utilizando câmara hemocitométrica fornece resultados confiáveis, porém demanda maior tempo e requer maior cuidado para a sua realização, necessitando de mão-de-obra qualificada e habilidosa (BORTOLOZZO et al. 2008). Por estes motivos, a maioria das CIAs opta por utilizar o espectofotômetro, que estima a quantidade de células da amostra por técnica indireta, por meio do grau de absorbância de luz pelo ejaculado (BORTOLOZZO et al. 2008). Ainda assim, o espectofotômetro pode não fornecer dados reais quando as amostras forem submetidas a aparelhos não calibrados ou, quando os ejaculados apresentarem alto grau de contaminação e aglutinação das células (BORCHARDT NETO et al. 1995). O sistema CASA apresenta resultados rápidos e precisos quanto à determinação do número de células, pois as contabiliza utilizando a contagem eletrônica de partículas (DIDION, 2008). No entanto, para que os resultados sejam confiáveis é necessário que os técnicos das CIAs sejam treinados e realizem a técnica de pipetagem e de preenchimento da câmara de forma correta (AMANN & WABERSKI, 2014).

A avaliação da morfologia espermática não é realizada em todas as coletas, pois tem como objetivo avaliar o reprodutor e não o ejaculado, sendo realizada com certa periodicidade, preferencialmente a cada 35-60 dias

(RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; BORTOLOZZO et al. 2005b; FOXCROFT et al. 2008), e por isso é considerada uma avaliação de rotina em CIAs. Esse intervalo entre análises é justificado pela duração de aproximadamente 39 dias do ciclo espermático de machos suínos (SENGER, 2003), sendo que, a cada novo ciclo deve-se realizar uma nova avaliação. O exame morfológico também deve ser realizado no ejaculado de todos os reprodutores jovens introduzidos na CIA, após o período de aclimação dos animais, que varia entre as primeiras 4 a 6 semanas de coleta (BORTOLOZZO et al. 2005b).

Para o exame morfológico deve-se coletar uma alíquota do ejaculado e fixar os espermatozoides em formol citrato previamente aquecido à mesma temperatura do ejaculado, sendo, em geral, uma gota de sêmen para 1 mL de solução fixadora. Para a análise do material, deve-se preparar uma lâmina com 5 a 10 microlitros do ejaculado fixado, coberto por lamínula, e observar os campos em microscópio óptico com contraste de fase, utilizando aumento de 1000x e óleo de imersão (FOXCROFT et al. 2008). Na avaliação são contados 200 espermatozoides por amostra, e são consideradas anormais as células que apresentam defeito de cabeça, colo, peça intermediária, cauda, acrossoma e presença de gota citoplasmática distal e proximal (CBRA, 1998). Considera-se aprovado o ejaculado que apresentar, de forma cumulativa, menos de 20% de células anormais, menos de 5% de defeitos de cabeça, acrossoma, colo e peça intermediária e menos de 10% de alterações de cauda e presença de gota citoplasmática proximal (CBRA, 1998). O defeito de gota citoplasmática distal não é considerado com significado patológico por alguns autores e por isso não é considerado como causa de reprovação de reprodutores em muitas CIAs (FONSECA et al. 1992; CBRA 1998; CORRÊA et al. 2001; BORTOLOZZO et al. 2005; BONET et al. 2013). No entanto, publicações internacionais consideram as gotas citoplasmáticas proximal e distal de forma conjunta, como por exemplo, a Indústria de Inseminação Artificial Alemã que estabeleceu o máximo requerido para essas alterações de 15% (WEITZE, 2012).

Como uma avaliação qualitativa, o exame de morfologia indica se o ejaculado está ou não dentro dos índices aceitáveis de células anormais. Porém,



quando os ejaculados são considerados dentro do limite aceitável de anormalidade, o teste não estabelece o nível real de fertilidade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ & ERIKSSON, 2000). Feitsma et al. (2006) avaliaram 512 000 ejaculados e observaram que quanto maior a quantidade de células com anormalidades, menor a fertilidade das fêmeas inseminadas, o que comprova que a realização desta monitoria tem grande efeito nos resultados a campo, evitando que ejaculados descartados causem impacto na produção de suínos.

Ainda com relação à morfologia espermática, existem técnicas computadorizadas e *softwares* que fazem a mensuração da quantidade de células anormais no ejaculado (HIRAI et al. 2001; BUTTS et al. 2011; ANTONCZYK et al. 2012), porém, estas são tecnologias ainda pouco utilizadas na rotina de CIAs. Um dos pontos relacionados à predileção por técnicas manuais para o exame de morfologia espermática está relacionado ao custo por análise e ao fato de que técnicas computadorizadas muitas vezes não são capazes de identificar todos os tipos de alterações morfológicas que as técnicas manuais identificam (BUTTS et al. 2011; ANTONCZYK et al. 2012).

#### Métodos alternativos de avaliação do ejaculado

Pesquisadores da área de andrologia buscam desenvolver novas metodologias de avaliação dos espermatozoides. O objetivo destes estudos é simplificar as análises realizadas rotineiramente nas CIAs e tornar os resultados mais confiáveis e preditivos quanto à fertilidade do reprodutor (RUIZ-SÁNCHEZ et al. 2006; BROEKHUIJSE, 2012). O motivo pelo qual os novos métodos desenvolvidos não são utilizados na rotina deve-se a diversos fatores, tais como, difícil aplicabilidade, alto custo, demora na execução, baixa repetibilidade e não identificação de machos com fertilidade subótima (GADEA et al. 1998; BERNARDI et al. 2008; TSAKMAKIDIS et al. 2010; WABERSKI et al. 2011). No entanto, busca-se aprimoramento e investimento nas técnicas para que estas possam ser colocadas em prática de forma satisfatória.

### Teste de integridade de membrana

Para que o metabolismo celular ocorra de forma adequada e o espermatozoide possa desenvolver suas funções corretamente, a membrana plasmática precisa estar íntegra. Por este motivo, o teste de integridade de membrana é considerado um teste interessante para determinar a viabilidade espermática, embora os resultados obtidos em diferentes estudos mostraram variabilidade na resposta *in vivo*. Gadea et al. (1998) utilizaram a metodologia para avaliação de ejaculados e observaram diferença entre ejaculados de alta e baixa fertilidade, porém não conseguiram diferenciar reprodutores com fertilidade intermediária. Já no estudo de Juonala et al. (1998) e Sutkeviciene et al. (2005), a integridade da membrana plasmática foi correlacionada com a taxa de prenhez e com o tamanho de leitegada, demonstrando que o teste tem poder preditivo para alguns parâmetros de interesse na produção.

O teste de integridade de membrana consiste na avaliação das células por meio de corantes, que podem ser o eosina-nigrosina ou ainda, corantes fluorescentes, como o Hoechst ou diacetato de carboxifluoresceína (BERGER et al. 1996; GADEA et al. 1998; GADEA et al. 2004). As células podem ser avaliadas utilizando citômetro de fluxo (PENÃ et al. 2003) e sistemas computadorizados (CASA) que possibilitam a avaliação de maior número de células do que métodos tradicionais. A metodologia da técnica indica contabilizar entre 100 (DZIEKOŃSKA et al. 2013) e 200 células em microscópio com aumento mínimo de 400x. Estudos recentes têm utilizado a técnica associada a outros testes para avaliação de sêmen *in natura* (SAMARDŽIJA et al. 2008), resfriado (REIS, 2002; DZIEKOŃSKA et al. 2013; LANGE-CONSIGLIO et al. 2013; GŁCZARZEWICZ et al. 2015) e sêmen criopreservado (GŁCZARZEWICZ et al. 2015).

### Teste de resistência osmótica ou hiposmótico

O teste de resistência osmótica tem como objetivo verificar a funcionalidade da membrana plasmática quando o espermatozoide é submetido a

uma solução hiposmótica (BERNARDI, 2008). Para a produção desta solução, pode-se misturar diluente, que é isosmótico, com água tipo II, transformando em uma solução de menor osmolaridade quando comparado ao ejaculado (SCHEID, 1993). Após a exposição das células por curto espaço de tempo nesta solução (PÉREZ-LLANO et al. 2003), é feita a contagem de espermatozoides com cauda enrolada, em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x e em óleo de imersão. A ocorrência de cauda enrolada indica que a membrana plasmática está funcional (PÉREZ-LLANO et al. 2003; BORTOLOZZO et al. 2005b).

Este é um teste considerado simples, de fácil execução e de baixo custo (GADEA, 2005), mas tem como inconveniente não ter a capacidade de identificar reprodutores que apresentam fertilidade subótima (GADEA et al. 1998) e os resultados nem sempre são relacionados à fertilidade *in vivo* (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ & ERIKSSON, 2000). Testes a campo mostraram correlação positiva entre parâmetros reprodutivos e resultados do teste hiposmótico. Druart et al. (2009) observaram aumento da taxa de parto, conforme houve aumento na resistência hipotônica dos ejaculados ( $p < 0,05$ ) e Pérez-Llano et al. (2001) e Gadea et al. (1998) observaram correlação positiva entre o teste hiposmótico e fertilidade *in vivo* ( $r = 0,43$ ,  $p < 0,01$ ) e nascidos totais ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,01$ ), respectivamente.

#### Teste de integridade de cromatina

A cabeça do espermatozoide é constituída pelo acrossoma, por estruturas citoesqueléticas, citoplasma e pelo núcleo (BELETTI, 2013). Esse é haploide, contendo um membro de cada par cromossômico e a cromatina, que se apresenta altamente condensada durante a última fase da espermatogênese (EDDY, 2006). O distúrbio da condensação da cromatina pode influenciar na fertilidade de reprodutores (GADEA, 2005), pois, por estar incompleto, o processo de condensação do DNA causa menor estabilidade nuclear e maior susceptibilidade à desnaturação do complexo DNA-proteína (TWIGG et al. 1998).

Existem diversas metodologias que podem ser utilizadas para avaliar a estabilidade da cromatina, sendo a análise da estrutura da cromatina espermática (do inglês *sperm chromatin structure assay* – SCSA) a mais utilizada (BELETTI, 2013). Esta técnica consiste no tratamento ácido dos espermatozoides, que são posteriormente corados com laranja de acridina e avaliados em citômetro de fluxo, com o objetivo de avaliar a susceptibilidade do DNA à desnaturação (EVENSON et al. 1980). Outros métodos menos utilizados na avaliação da cromatina espermática são o teste de Feulgen, TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*), teste de laranja de acridina, Comet, teste de dispersão da cromatina espermática (*sperm chromatin dispersion* - SCD), teste de azul de anilina e teste de azul de toluidina (ERENPREISS et al. 2001; BUNGUN, 2012; BELETTI, 2013; EVENSON, 2016).

Apesar de apresentarem metodologias diferentes, estudos relatam uma moderada à alta correlação positiva entre os resultados obtidos utilizando diferentes técnicas. Erenpreiss et al. (2001) observaram correlação de 0,63 a 0,70 ( $p < 0,01$ ) quando compararam os resultados das técnicas de coloração de laranja de acridina, coloração de azul de anilina e de coloração de azul de toluidina. Bungum (2012) encontrou correlação entre 0,4 a 0,7 quando comparou os resultados dos testes SCSA, TUNEL, Comet e SCD.

Estudos *in vivo* mostram que a análise da integridade da cromatina é capaz de prever falha na fecundação, mas não é capaz de prever a fertilidade do reprodutor (EVENSON et al. 1994). O que se nota nos estudos realizados é que existe dificuldade em estipular um valor máximo aceitável para o índice de fragmentação do DNA, já que muitos dos valores encontrados são considerados baixos, estando entre 0 e 9% (SARAVIA et al. 2007; WABERSKY et al. 2002, VOLKER, 2004 e MARTÍNEZ, 2005).

#### Morfometria da cabeça do espermatozoide

Por haver evolução conjunta no que se refere à arquitetura das células espermáticas durante a fase de espermatogênese, as características do flagelo,

da peça intermediária e da cabeça dos espermatozoides são correlacionadas positivamente (GIL et al. 2009). Desta forma, alterações na conformação da célula como um todo pode ser um indicativo de problemas no ejaculado e, consequentemente, de problemas reprodutivos do reprodutor. Gaggini et al. (2015) mostraram que ejaculados de suínos que apresentaram maior porcentagem de alterações morfológicas, não necessariamente relacionadas à cabeça, apresentaram diferente conformação de cabeça do que ejaculados com maior quantidade de células consideradas normais. Estudos com outras espécies mostraram que a variação na morfologia da cabeça do espermatozoide é um marcador sensível para anormalidade na cromatina e para a fertilidade do animal (HINGST et al. 1995; KARABINUS et al. 1997).

Apesar dos poucos estudos realizados nessa linha de pesquisa, quando se compara os dados de morfometria espermática, obtidos na literatura, observa-se uma diferença considerável nos parâmetros analisados. Hirai et al. (2001) - que estudaram células de animais Pietran -, Saravia et al. (2007) - que mensuraram espermatozoides de animais das linhagens Duroc, Large White, Landrace e híbridas- e, Gaggini et al. (2015) - que avaliaram células de animais híbridos - encontraram médias de área de cabeça variando entre 34,4  $\mu\text{m}$  e 45,55  $\mu\text{m}$ , perímetro variando entre 17,94  $\mu\text{m}$  e 26  $\mu\text{m}$  e largura variando entre 4,23  $\mu\text{m}$  e 4,5  $\mu\text{m}$ . Esta variação pode ser justificada pela diferença entre linhagens/raças dos animais utilizados (SARAVIA et al. 2007; KONDRACKI et al. 2012), ou ainda, pela diferença na metodologia empregada para mensuração das cabeças (BOERSMA et al. 1999). Dessa forma, caso opte-se por utilizar esse teste em CIAs, deve-se manter um padrão de metodologia e de análise, para que os resultados façam sentido e possam ser utilizados de forma adequada.

#### Capacitação e reação acrossômica

O teste de capacitação e reação acrossômica tem como objetivo identificar alterações no acrossoma de espermatozoides, utilizando corantes fluorescentes, como a clortetraciclina ou lectinas conjugadas a corantes (BERNARDI, 2008). A

reação acrossômica pode ocorrer espontaneamente ou de forma induzida, por meio do contato com proteínas da zona pelúcida ou com cálcio ionóforo (HOLT et al. 1997). Apesar dos resultados obtidos em diferentes estudos apresentarem-se contraditórios, quanto à determinação da fertilidade de reprodutores (PETRUNKINA et al. 2005, OH et al. 2010), a menor ocorrência de reação acrossômica precoce foi associada a maior número de nascidos totais (HOLT et al. 1997) e maior taxa de parto (OH et al. 2010).

Segundo Harkema et al. (1998), deve-se também levar em consideração a velocidade em que a capacitação ocorre. Dessa forma, provavelmente, espermatozoides que respondem mais lentamente ao processo de capacitação apresentam maior potencial fecundante *in vivo* do que espermatozoides que respondem rapidamente (PETRUNKINA et al. 2007).

#### Fecundação *in vitro* (FIV)

O objetivo da FIV é mimetizar acontecimentos bastante complexos que ocorrem durante o processo de fecundação *in vivo* e, com isso, predizer a fertilidade das amostras de ejaculados e de reprodutores (BERNARDI, 2008). Apesar de apresentar resultados interessantes quando há variação de fertilidade entre reprodutores (CORCINI et al. 2011), no geral, este é um teste que apresenta uma grande divergência entre os resultados, não sendo sempre correlacionados com características de importância na produção (XU et al. 1998; POPWELL; FLOWERS, 2004). Além disso, outros motivos que inviabilizam o teste em CIAs estão relacionados ao custo elevado e a demora na execução da metodologia (GADEA, 2005). A dificuldade em comparar resultados deve-se aos divergentes protocolos de FIV realizados.

#### Número de espermatozoides acessórios

A contagem de espermatozoides acessórios é uma técnica que tem como objetivo quantificar espermatozoides com características necessárias para se

deslocar no trato reprodutivo da fêmea e se ligar e penetrar de forma parcial na zona pelúcida (GADEA, 2005). Estudos apresentam resultados controversos quanto à utilização desta técnica para predizer a fertilidade de reprodutores. Enquanto Stahlberg et al. (2000) obtiveram correlação entre o número de espermatozoides acessórios e número de nascidos totais, Harkema et al. (2004) não observaram diferença entre reprodutores com espermatozoides com maior ou menor capacidade de ligação à zona pelúcida.

### 3.1.3 Efeito da diluição e do processamento do ejaculado e do armazenamento das doses inseminantes

Depois de ejaculada, a célula espermática sofre manipulações que podem influenciar na qualidade das DIs a serem utilizadas na IA. O desafio de estudos e pesquisas é de minimizar o efeito das manipulações sobre o espermatozoide e seu poder fecundante, e de aumentar a durabilidade e viabilidade das células utilizando diluentes e técnicas de diluição, envase, resfriamento e criopreservação das DIs.

#### Diluição do ejaculado, envase e estabilização das DIs

Devido o uso da técnica de IA em rebanhos suínos, nos últimos anos houve um aumento significativo no número de DIs produzidas por hora nas CIAs (WABERSKI, 2009). Inicialmente, com a utilização da técnica tradicional de IA, com deposição intracervical profunda da DI, utilizava-se em média 3 bilhões de espermatozoides por DI (BORTOLOZZO et al. 2002). No entanto, a introdução de novas técnicas, como a IA intra-uterina (IAIU) e IA intra-uterina profunda (IAIUP), possibilitaram alteração na quantidade de células por DI (GARCIA et al., 2007), alterando o padrão de produção. Estima-se que com essa redução do número de células espermáticas, pode-se obter um ganho de até 300% no número de DIs produzidas por reprodutor, por ejaculado (BENNEMANN, 2005).

Concomitantemente ao desenvolvimento de novas técnicas de IA, ocorreu a evolução no desenvolvimento de diluentes responsáveis pela manutenção das células espermáticas por um determinado período de tempo (BUSSALLEU; TORNER, 2013). Inicialmente, foram desenvolvidos diluentes de sêmen padronizados com duração de três dias (BORTOLOZZO et al. 2005) e, posteriormente, diluentes de sêmen de média (quatro a cinco dias) e longa ação (sete a dez dias) (GADEA, 2003), possibilitando maior durabilidade às DIs.

A diferença na composição dos diluentes é o fator que vai determinar o tempo de conservação dos espermatozoides. Basicamente, os diluentes têm como composição a glicose, responsável pela manutenção do metabolismo espermático, agentes tamponantes, sais reguladores da pressão osmótica, além de antimicrobianos, que atuam inibindo o crescimento de agentes patogênicos (GADEA, 2003). Outras substâncias também podem ser adicionadas, como o ácido etileno diamino tetra-acético, a albumina sérica bovina e antioxidantes, que atuam, de forma geral, como protetores de membrana (BUHR, 1990; JOHNSON et al. 2000; PETRUSKA et al. 2014; ZHANG et al. 2015).

O protocolo de diluição realizado em CIAs consiste na preparação do diluente (mistura do diluente em pó com a água tipo II), na realização do cálculo de doses (baseado nos dados de volume e concentração espermática obtidos durante a avaliação do ejaculado *in natura*), na mistura da quantidade exata de diluente estabilizado no ejaculado, podendo esta etapa ser realizada em um ou dois passos (com pré-diluição 1:1), e na avaliação da motilidade espermática do ejaculado pós-diluição. Se aprovado com mais de 70% de células móveis e diferença menor do que 10% do ejaculado *in natura*, o ejaculado diluído deve ser submetido ao envase, seguindo como critério o resultado obtido no cálculo de DIs (FLOWERS, 1997; RUIZ-SÁNCHEZ et al. 2006).

O envase pode ser realizado utilizando envasadoras manuais, em CIAs de pequeno a médio porte, e/ou utilizando envasadoras automáticas, para CIAs de porte médio a grande. O formato e material utilizado como invólucro dependem do volume das DIs e do tipo de envasadora utilizada. Após envasadas, as DIs ficam



entre 60 a 90 minutos em temperatura ambiente, para realização da estabilização da temperatura.

Os estudos que envolvem esse tópico englobam a criação de novos diluentes, sistemas de diluição diferenciados, como diluidores automáticos, que já são comercializados, técnicas de envase que minimizem a manipulação do ejaculado e o risco de contaminação das DIs.

### Resfriamento das DIs

Quando ejaculado, o sêmen suíno se encontra próximo da temperatura corporal do reprodutor, estando entre 33 e 36 °C. Ao final do período de estabilização das DIs, o ideal é que a temperatura esteja próxima da temperatura ambiente do laboratório, que, em geral, fica entre 20 a 24 °C. Uma preocupação frequente quanto a esse processo é que a diminuição da temperatura das DIs seja de forma lenta e progressiva. Com o propósito de reduzir os riscos de choque térmico, a diluição usualmente é realizada utilizando diluente aquecido, mantido a temperatura próxima a do ejaculado (LÓPEZ RODRIGUEZ et al. 2012). No entanto, estudos recentes comprovaram que os espermatozoides não são tão sensíveis a ponto de sofrerem choque térmico quando o diluente foi mantido em temperatura ambiente (PETRUNKINA et al. 2005; ALMEIDA et al. 2015). Sendo assim, ainda há uma discussão nesse sentido e, provavelmente, novos estudos serão realizados buscando elucidar a real necessidade do pré-aquecimento de diluentes.

O resfriamento das DIs tem como objetivo reduzir a atividade metabólica das células espermáticas e, com isso, prolongar sua vida útil (BUSSALLEU; TORNER, 2013). Na suinocultura, as DIs são resfriadas e não congeladas, devido à composição da membrana plasmática dos espermatozoides, que apresenta sensibilidade frente ao choque térmico pelo congelamento (HOLT, 2000). Após a diluição, envase e estabilização das DIs, estas são resfriadas em temperatura variando entre 15 a 18 °C (BORTOLOZZO et al. 2005b). Muitos estudos buscam técnicas e diluentes que permitam que as células espermáticas continuem viáveis

quando submetidas a diferentes temperaturas (CORRÊA et al. 2006; HU et al. 2006; JULIANO et al. 2009; SEVERO et al. 2011; ALMEIDA et al. 2015; GŁCZARZEWICZ et al. 2015). Ainda assim, essa é uma área que apresenta diversos pontos a serem trabalhados a fim de otimizar a produção de DIs em CIAs.

#### Homogeneização e técnica de envase na qualidade das doses inseminantes

O efeito e a importância da diluição do ejaculado já foram discutidas anteriormente, porém, a partir de avaliações da qualidade das DIs ao longo do tempo surgiram novos questionamentos a respeito da durabilidade destas durante seu armazenamento. A partir de então, paradigmas que sempre foram estabelecidos na produção de DIs passaram a ser questionados e testados a fim de elucidar a real necessidade de processamentos específicos na rotina de CIAs.

Um dos manejos bem estabelecidos em CIAs e em granjas após o recebimento das DIs é o de homogeneizar as DIs pelo menos uma vez ao dia durante o seu armazenamento. O efeito benéfico deste processo estaria relacionado à ressuspensão das células espermáticas e redistribuição uniforme dos componentes do diluente (RODRIGUEZ-GIL & RIGAU, 1995), além de possibilitar a conferência do funcionamento da conservadora de DIs e estabelecer o número de doses disponíveis a serem utilizadas na IA (BELSTRA, 2007). No entanto, nem todos os estudos realizados nessa área constataram resultados benéficos provenientes da homogeneização de doses (SIMMET et al. 1998; SCHULZE et al. 2015; MENEGAT et al. 2017) e esta prática vem sendo desencorajada por pesquisadores. Relatos de campo ainda questionam o efeito negativo da homogeneização e indicam que, para algumas linhagens e raças puras, a falta de homogeneização das DIs acaba acarretando em aumento de aglutinação e redução da motilidade espermática. Ainda assim, esta é uma área bastante promissora e que deve ser estudada a fim de que se estabeleçam critérios que levem ao aumento da durabilidade das DIs.

A possibilidade de redução da quantidade de ar no interior da dose envasada é um tema bastante discutido, porém poucos estudos buscaram elucidar se a presença de ar realmente causa um efeito negativo na qualidade da DI. Ao realizar o envase manual, muitos técnicos sugerem apertar o frasco no momento de rosquear a tampa, a fim de minimizar a quantidade de ar no interior da DI, porém, nunca se soube ao certo qual o aspecto positivo desse manejo na qualidade da dose. Em um estudo recente, Ribeiro et al. (2016) avaliaram o efeito do ar no interior das doses inseminantes e comprovaram que a presença de ar afeta negativamente a qualidade das DIs, ao longo dos dias de armazenamento. Dessa forma, novas técnicas de manejo e de envase da dose devem ser estudadas futuramente a fim de garantir que o sêmen diluído tenha menos contato possível com o ar, quando armazenado.

#### 3.1.4 Criopreservação do ejaculado suíno

O congelamento do ejaculado suíno é um tema que vem sendo bastante estudado e obteve importantes avanços nos últimos anos (YESTE, 2015). Esta tecnologia, apesar de ser a mais adequada para manter o ejaculado suíno viável por longos períodos de tempo, ainda é pouco disseminada, sendo utilizada em menos de 1% das IAs realizadas em todo o mundo (RODRIGUEZ-GIL & ESTRADA, 2013).

Um dos motivos pelo o qual esta tecnologia é pouco utilizada está relacionado ao fato de que os procedimentos de criopreservação podem reduzir o potencial de fertilização do reprodutor, sendo este efeito negativo variável de acordo com a sensibilidade dos espermatozoides de cada animal. O congelamento provoca uma desestabilização na membrana plasmática dos espermatozoides, que afeta o metabolismo celular e funções vitais para a manutenção da célula espermática (MAXWELL & JOHNSON, 1997; LEAHY & GADELLA, 2011; VADNAIS & ALTHOUSE, 2011). Além da alteração na membrana, são descritos danos à cromatina espermática após o descongelamento (ALKMIN et al. 2013; YESTE et al. 2013), danos na interação

entre a teca perinuclear e rede de actina (GUTIÉRREZ-PÉREZ et al. 2011) e à atividade mitocondrial da célula (FLORES et al. 2010; KUMARESAN et al. 2011).

Os estudos na área de criopreservação do ejaculado suíno buscam, na sua maioria, metodologias e suplementos que neutralizem ou diminuam o efeito negativo do processo sobre as células espermáticas (RODRIGUEZ-MARTINES & WALLGREN, 2011). Os possíveis benefícios do congelamento, na rotina da produção de suínos, geram demanda por pesquisas nessa área, e, certamente, no futuro novas técnicas e produtos surgirão visando esse nicho de mercado.

### **3.2 Fatores genéticos relacionados ao desempenho reprodutivo do macho suíno**

A genética de machos suínos afeta diretamente o número de nascidos totais e a taxa de parto, além de ser determinante na definição de características de carcaça, ganho de peso e conversão alimentar da progênie. Por influenciar apenas nos resultados reprodutivos das fêmeas inseminadas, as análises seminais não são considerados importantes critérios de seleção na suinocultura, e é comum a utilização de dados de característica de carcaça, ganho de peso e conversão alimentar como prioridades na seleção de reprodutores (LOPES et al. 2001; ROBINSON & QUINTON, 2002; FLOWERS, 2008).

A não inclusão de características reprodutivas em projetos de melhoramento justifica-se devido as suas baixas herdabilidades e sua expressão limitada (LOPES et al. 2001; ROBINSON & QUINTON, 2002). No entanto, com a utilização de novas metodologias de análise de dados tornou-se possível à inclusão de características reprodutivas em modelos criados para a seleção e melhoramento dessa espécie (LOPES et al. 2001).

A inclusão dos marcadores moleculares relacionados a características seminais desejáveis possibilitam a seleção de animais pré-púberes, mesmo antes de se realizar a primeira coleta do ejaculado.

### 3.2.1 Identificação de genes por meio de marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são variações, denominadas de polimorfismo, que ocorrem na molécula de Ácido Desoxirribonucleico (DNA, do *inglês deoxyribonucleic acid*) e que tornam possível fazer a distinção de dois indivíduos (PEREIRA, 2008). Os polimorfismos acontecem devido à ocorrência de mutações, originadas principalmente de substituições de bases, deleções (remoção de nucleotídeo(s) de um gene ou de um segmento de um cromossomo) e inserções (inserção de pares de bases extras no DNA).

Por estarem localizados na molécula de DNA, os marcadores moleculares são herdáveis e por isso podem ser transmitidos de geração para geração. Existem diversos marcadores moleculares possíveis de serem caracterizados no melhoramento genético, sendo que, basicamente, o que difere entre eles é a forma pelo qual o polimorfismo é detectado (PEREIRA, 2008; CAETANO, 2009). Dentre os marcadores existentes, os marcadores SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) vêm sendo bastante utilizados nos últimos anos (CAETANO, 2009).

### 3.2.2 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP)

Os SNPs são uma forma bastante comum de variação da sequência do DNA que ocorre em uma porção significativa da população, estabelecida em mais de 1% (BROOKES, 1999). Os marcadores SNPs são caracterizados por serem alterações de uma única base da cadeia (adenina, citosina, timina e guanina) e podem ser encontrados em regiões codificadoras ou em espaços intergênicos do DNA (CAETANO, 2009).

Um indivíduo pode possuir milhões de SNPs em seu DNA (LI et al. 2009) e a correlação dos SNPs com variáveis fenotípicas de interesse pode auxiliar na identificação de genes que interferem em uma determinada característica.

Basicamente, a detecção de SNPs ocorre por meio da identificação de um fragmento com alteração de bases em comparação com uma sequência de referência (CAETANO, 2009).

Atualmente, chips de genotipagem contendo mais de 50 mil SNPs são utilizados para diversas espécies de animais (CAETANO, 2009), sendo mais utilizado em suínos o Illumina PorcineSNP60 Beadchip (ZHANG et al. 2012; DINIZ, 2013).

### 3.2.3 Estudo Amplo de Associação Genômica (GWAS)

O GWAS (do inglês *genome-wide association study*) tem como objetivo associar SNPs com características mensuráveis de interesse para diferentes espécies (PEARSON & MANOLIO, 2008). Além de utilizar os SNPs, o GWAS também utiliza informações fenotípicas e de pedigree para fazer a análise de associação e, então, identificar genes ou elementos regulatórios que influenciam na característica de interesse (ZHANG et al. 2012).

Inicialmente, o GWAS foi utilizado visando esclarecer dúvidas relacionadas a doenças em humanos (VISSCHER et al. 2012; ZHANG et al. 2012), e, posteriormente, passou a ser utilizado em outras espécies, inclusive a suína. A realização do GWAS em animais domésticos e de produção tornou-se possível devido ao desenvolvimento de chips com grandes quantidades de SNPs (CAETANO, 2009; ZHANG et al. 2012).

### 3.2.4 Resultados obtidos com GWAS em suínos

Em suínos, o GWAS já foi realizado em alguns estudos que envolveram a avaliação do efeito macho/odor do macho, composição corporal e de carcaça, consumo de ração, parâmetros reprodutivos em matrizes e leitoas e em machos (Tabela 1).

Tabela 1. Compilado de estudos amplos de associação genômica (GWAS) realizados com suínos.

| <b>Autores</b>           | <b>Característica fenotípica</b>       | <b>SNPs e genes</b>        | <b>Linhagem</b>            |
|--------------------------|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| DUIJVESTEIJN et al. 2010 | Níveis de androstenona                 | 37 SNPs do C1 e C6         | Duroc                      |
| RAMOS et al. 2011        | Níveis de escatol                      | 16 SNPs do C6              | Duroc                      |
| GRINDFLEK et al. 2011    | <i>Boar taint</i>                      | 28 regiões do C11          | Landrace e Duroc           |
| FAN et al. 2011          | Composição corporal                    | 5 GC                       | Fêmeas comerciais          |
| PONSUKSILI et al. 2011   | Área de gordura                        | 663 GC                     | Híbridos                   |
| DO et al. 2013           | Consumo de ração                       | 76 SNPs                    | Duroc                      |
| ONTERU et al. 2012       | NT, NV, NAT, MUM e duração da gestação | 13 GC de 9 C               | Large White x Landrace     |
| NONNEMAN et al. 2016     | Idade à puberdade                      | 2 GC                       | Híbridas                   |
| DINIZ et al. 2014        | Motilidade espermática                 | 1 GC                       | Large White                |
| ZHAO et al. 2016         | Características reprodutivas de machos | 10 regiões de diferentes C | White Duroc x Erhualian F2 |

NT – nascidos totais, NV – nascidos vivos, NAT – natimortos, MUM – mumificados, SNP – nucleotídeo de polimorfismo único, GC – gene candidato, C – cromossomo

Apesar das publicações previamente citadas, ainda existem muitas lacunas no que se refere à associação de genes com características reprodutivas. Novos estudos que tem como objetivo a utilização desta metodologia para a seleção de reprodutores, visando não somente características de carcaça, mas

também aspectos reprodutivos, provavelmente serão realizados, buscando métodos mais eficientes de seleção de reprodutores e, conseqüentemente, uma otimização na produção de suínos (LIN, 2005; OH et al. 2010).



## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; RAKESHK, S.; DAVID, R.; NELSON, D. R. New Semen Quality Scores Developed by Principal Component Analysis of Semen Characteristics. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 24, n.3, p. 343-352, 2003.

ALKMIN, D.V.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. **Theriogenology**, Stoneham, v.79, p.1294-1300, 2013.

ALMEIDA, M.C.S.; MORONI, J.L.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. BORTOLOZZO, F.P. Impact of isothermic and bithermic dilution on quality of chilled boar sperm. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.12, n.4, p. 903-909, 2015.

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

ANTONCZYK, A.; NIZANSKI, W.; PARTYKA, A.; OCHOTA, M.; MILA, H. The usefulness of Real Time Morphology software in semen assessment of teratozoospermic boars. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, Abingdon, p. 1-7, 2012.

ASSUMPÇÃO, T.I.; TORRES JR, R.A.A.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore Bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, p. 55-61, 2005.

BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, Basel, v.50, p.626-640, 1995.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p. 92-96, 2013.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 25; p.97-107, 2003.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, São Paulo, v. 22, p.85-90, 2005a.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, p.105-116, 2005b.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 79, p.17-23, 2004.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Testicular and semen alteration after three days of experimental cryptorchidism in rabbit. **Brazilian Journal of Morphological Science**, São Paulo, v.14, p. 88-88, 1997.

BELIBASAKI, S.; AMIRIDIS, G.; LYMBEROPOULOS, A.; VARSAKELI, S.; KOUSKOURA, T. Ram seminal plasma and fertility: results from an ongoing field study. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapeste, v. 48, p.335-341, 2000.

BELSTRA, B. On-farm semen receiving, storage and use for a successful AI program. **Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar**. Clinton, North Carolina, USA, 2007, 9p.

BENNEMANN, P.E. **Redução do número de espermatozoides por fêmea inseminada por ano**. 81f. Tese – Doutorado em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BENYAMIN, B.; VISSCHER, P.M.; MCRAE, A.F. Family-based genome-wide association studies. **Pharmacogenomics**, New York, v.10, n.2, p.181-190, 2009

BERGER, T.; ANDERSON, D.L.; PENEDO, M.C.T. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 44, p. 231-239, 1996.

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

BJÖRNDAHL, L.; KVIST, U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.16, p. 23-29, 2010.

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

BOERSMA, A. A.; BRAUN, J.; STOLLA, R. Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.34, p. 77-82, 1999.

BONET, S.; GARCIA, E. SEPÚLVEDA, L. **The boar reproductive system**. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 65-107.

BORCHARDT NETO, G.; GUIDONI, A.L.; BORTOLOZZO, F.P.; FERREIRA, F.M.; WENTZ, I. Modelo logístico para estimar a concentração espermática pela fotolorimetria. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1995, Blumenau, **Anais...** Blumenau: ABRAVES, 1995, p.137.

BORTOLOZZO, F.P.; GOLDBERG, A.M.G.; WENTZ, I. Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade? **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.36, Supl.1, p. 17-26, 2008.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Avanços na inseminação artificial de suínos. In ENCONTROS TÉCNICOS DA ABRAVES – RS, 2002, Estrela, **Anais...**, Estrela: ABRAVES, p. 1-20.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, p. 17-32, 2005a.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; et al. **Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 2005b.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J. **Prediction of porcine male fertility**, 2012. 236f. Dissertation - Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, the Netherlands, 2012.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Field data analysis of boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.46, n.2, p. 59-63, 2011.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination centre, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v.77, p. 1466-1479, 2012.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, v. 234, n.2, p.177-86, 1999.

BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, Suppl. 1, p.81-93, 1990.

BUNGUM, M. Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility. **Obstetrics and Gynecology International**, Nasr City, v.2012, p. 1-6, 2012.

BUSSALLEU, E.; TORNER, E. Quality improvement of boar seminal doses. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. (Eds). **Boar Reproduction – Fundamentals and new biotechnological trends**. Berlin: Springer, 2013, p.517-550.

BUSO, D.; COHEN, D.J.; HAYASHI, M.; KASAHARA, M.; CUASNICU, P.S. Human testicular protein TPX1 / CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.11, p. 299–305, 2005.

BUTTS, I.A.E.; WARD, M.A.R.; LITVAK, M.K.; PITCHER, T.E.; ALAVI, S.M.H.; TRIPPEL, E.A.; RIDEOUT, R.M. Automated sperm head morphology analyzer for open-source software. **Theriogenology**, Stoneham, v.76, p.1756-1761, 2011.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; MAYOR, G.M.; ALMINAANA, C.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 32, p. 505–513, 2009.

CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p.64-71, 2009.

CALVETE, J.J.; ENSSLIN, M.; MBURU, J.; IBORRA, A.; MARTÍNEZ, P.; ADERMANN, K.; WABERSKI, D.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WEITZE, K.F.; EINARSSON, S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. **Biology of Reproduction**, New York, v.57, p. 735–742, 1997.

CALVETE, J.J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. **Society for Reproduction and Fertility**, Teddington, v.65, p. 201-215, 2007.

CEVIK, M.; TUNCER, P.B.; TASDEMIR, U.; OZGURTAS, T. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v.31, p. 381-387, 2007.

CHIA, S.E.; ONG, C.N.; CHUA, L.H.; HO, L.M.; TAY, S.K. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters

between fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v.21, p.53-57, 2000.

CHIKHI, N., HOLIC, N., GUELLAEN, G. AND LAPERCHE, Y. Gammaglutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v.122, p. 367-380, 1999.

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

COLAGAR, A.H.; MARZONY, E.T.; CHAICHI, M.J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. **Nutrition Research**, New York, v. 29, p. 82-88, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

CORCINI, C.D.; FERREIRA, C.E.R.; GOULARTE, K.L.; MADEIRA, E.M.; BIACHI, I.; LUCIA, T.JR.; VARELA JUNIOR, A.S. Inovações tecnológicas na avaliação de sêmen suíno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 15., 2011, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza, 2011, p. 161-175.

CORRÊA, M.N.; LUCIA JR, T.; BIANCHI, I. SCHMITT, E.; BORDIGNON, J.; RECH, D.C.; PERUZZO, I.A.; DESCHAMPS, J.C. Swine semen cooled at 5 °C with PIGPEL-5 extender: effects on semen quality in vitro and fertility estimators in vivo. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1 , p. 41-48, 2006.

DAPINO, D.G.; TEIJEIRO, J.M.; CABADA, M.O.; MARINI, P.E. Dynamics of heparin-binding proteins on boar sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 116, p. 308-317, 2009.

DAVIES, D.C.; HALL, G.; HIBBITT, G.; MOORE, H.D. The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 43, p. 305-312, 1975.

DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standard for CASA instruments. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 14, p. 385-394, 1993.

DIDION, B.A. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, p. 1347-1376, 2008.

DINIZ, D.B. **Genome-wide association study for sperm motility in pigs**. Dissertação em Genética e Reprodução – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

DINIZ, D.B.; LOPES, M.S.; BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; LOPES, P.S.; HARLIZIUS, B.; GUIMARÃES, S.E.F.; DUIJVESTIJN, N.; KNOL, E.F.; SILVA, F.F. A genome-wide association study reveals a novel candidate gene for sperm motility in pigs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 151, p. 201-207, 2014.

DO, D.N.; STRATHE, A.B.; OSTERSEN, T.; JENSEN, J.; MARK, T.; KADARMIDEEN, H.N. Genome-wide association study reveals genetic architecture of eating behavior in pigs and its implications for human obesity by comparative mapping. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 8, e71509, 2013.

DRUART, X.; GATTI, J.; HUET, S.; DACHEUX, J.; HUMBLLOT, P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with



epididymal maturation and fertility. **Reproduction**, Cambridge, v.137, p. 205-213, 2009.

DUIJVESTEIJN, N.; KNOL, E.F.; MERKS, J.W.M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; GROENEN, M.A.M.; BOVENHUIS, H.; HARLIZIUS, B. A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. **BMC Genetics**, London, v. 11, p. 42, 2010.

DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.F.; NOVAK, S.; RUIZ-SANCHEZ, A.; PATTERSON, J.; DIXON, W.T. Biological markers of boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, p. 55-58, 2011.

DZIEKOŃSKA, A.; FRASER, L. ; MAJEWSKA, A. ; LECEWICZ, M. ; ZASIADCZYK, L.; KORDAN, W. Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17 °C. **Polish Journal of Veterinary Science**, Olsztyn, v.16, n.3, p. 517-525, 2013.

EDDY, E.M. The spermatozoon. In: NEILL, J.D. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. New York: Elsevier, 2006. v.1, p. 3-54.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative study of citochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2001.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, Washington, v.210, p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P. The sperm chromatin structure assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 169, p. 56-75, 2016.

EVENSON D.P.; THOMPSON L.; JOST L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, Stoneham , v.41, p. 637-651, 1994.

FAN, B.; ONTERU, S.K.; DU, Z.-Q.; GARRICK, D.J.; STALDER, K.J.; ROTHSCCHILD, M.F. Genome-wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs. **PLoS ONE**, San Francisco, v.6, n. 2, p.14726, 2011.

FÁVERO, J.A.; FIGUEIREDO, E.A.P. Evolução do melhoramento genético de suínos no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56, n.4, p. 420-427, 2009.

FEITSMA. H.; BERGSMA. R.; DUCRO-STEVERINK D.W,. The effect of morphological abnormal cells on sow fertility. In: International Pig Veterinary Society Congress, 19., 2006, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen, 2006, p. 545.

FEITSMA, H.; BROEKHUIJSE, MLWJ, GADELLA, B.M. Do CASA Systems Satisfy Consumers Demands? A Critical Analysis. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, Suppl. 2, p. 49-51, 2011.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUES-GIL, J.E. Cyopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. **Theriogenology**, Stoneham, v.74, 354-363, 2010.

FLOWERS, W.L. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1297-1303, 2008.

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

FLOWERS, W.L. Semen evaluation, extension, packaging and transportation methods. **American Association of Swine Practitioners**, Perry, p. 469-479, 1996.

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

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

GŁCZARZEWICZ, D.; UDALA, J.; PIASECKA, M.; BLASZCZYK, B.; STANKIEWICZ, T. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 39, p. 582-594, 2015.

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

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, p. 431-444, 2005.

GADEA, J.; MATAS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP/assay. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.56, p. 95-108, 1998.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.39, p. 303-308, 2004.

GAGGINI, T.S.; ROCHA, L.O.; ARANTES, V.M.; SOUZA, E.T.; MOURA, T.S.; ANTUNES, R.C.; BELETTI, M.E. Morfometria espermática de reprodutores suínos aprovados e reprovados no teste de morfologia seminal. In CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 17., 2015, Campinas, **Anais...** Campinas: ABRAVES, p.448.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V.; CAR, A. *In vitro* effect of zinc on superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes of diabetic patients. **Acta Diabetologica**, Berlin, v. 37, p. 135–137, 2000.

GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; RAUDSEPP, T.; PIUMI, F.; SCHAMBONY, A.; GUERIN, G.; CHOWDHARY, B.P.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Gene**, Amsterdam, v. 299, p. 101-109, 2002.

GIL, M.C.; GARCÍA-HERREROS, M.; BARÓN, F.J.; APARICIO, I.M.; SANTOS, A.J.; GARCÍA-MARÍN, L.J. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. **Theriogenology**, Stoneham, v.71, p. 254-263, 2009.

GRINDFLEK, E.; LIEN, S.; HAMLAND, H.; HANSEN, M.H.; KENT, M.; VON SON, M.; MEUWISSEN, T.H. Large scale genome-wide association and LDLA mapping study identifies QTLs for boar taint and related sex steroids. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 1-16, 2011.

GUNAWAN, A.; CINAR, M.U.; UDDIN, M.J.; KAEWMALA, K.; TESFAYE, D.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K. Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gene for boar sperm quality and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, p. 782-790, 2012.

GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.L.; MOTA, D.; TRUJILLO, M.E. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. **Cryobiology**, v. 62, p.32-39, 2011.

HANSEN, C.; CHRISTENSEN, P.; STRYHN, H.; HEDEBOE, A.M.; RODE, M.; BOE-HANSEN, G. Validation of the FACSCount AF System for determination of sperm concentration in boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, p. 330-334, 2002.

HARKEMA, W.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.A.; TOPPER, E.K.; WOELDERS, H. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. **Biology of Reproduction**, New York, v.58, p.421-430, 1998.

HARKEMA, W.; VISSER, I.; SOEDE, N.M.; KEMP, B.; WOELDERS, H. Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins in vitro in relation to fertilization rates in vivo. **Theriogenology**, Stoneham, v.61, p. 227-238, 2004.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 108, p. 199-204, 1996.

HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. **Andrology**, Copenhagen, v. 27, n.5, p. 275-279, 1995.

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A.; WOLF, E.; FOLL, J.; AUMÜLLER, T.R.; BRAUN, J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 22, n.1, p. 104-110, 2001.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 3-22, 2000.

HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D.M.; REED, H.C.B.; CURNOCK, R.M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 18, p. 312-323, 1997.

HU, J.H.; LI, Q.W.; LI, G.; CHEN, X.Y.; YAHNG, H.; ZHANG, S.S.; WANG, L.Q. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 19, n. 4, p. 486-490, 2006.

JIWAKANON, J.; DALIN, A.M. Short communication: concentration of TGF- $\beta$ 1, IL-10 and IL-6 in boar seminal plasma and TGF- $\beta$ 1 level in different fractions of ejaculates. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 131, p.194–198, 2012.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P.; MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 2053–2062, 2005.

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

JULIANO, F.; SERRET, C.G.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V.R.; NOGUEIRA, C.E.W.; VIDOR, T.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N. Efeito do diluente pigpel na qualidade do semen suíno refrigerado em diferentes temperaturas. **Semina**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 899-906, 2009.

JUONALA, T.; LINTUKANGAS, T.S.; NURTTILA, T.; ANDERSSON, M. Relationship Between semen quality and fertility in 106 AI-boars. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 33, p. 155-158, 1998.

JUYENA, N.S.; STELLETTA, C. Seminal Plasma: An essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v.33, n.4, p. 536-551, 2012.

KARABINUS, D.S.; VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v.18, p. 549-555, 1997.

KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. **Small Ruminant Research**, Oxford, v.44, p.153–158, 2002.

KING, G.J.; MACPHERSON, J.W. Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 30, p. 304-307, 1966.

KOHDARA, T.; KINOSHITA, Y.; KONNO, M.; OSHIMA, H. Distribution of gamma-glutamyl transpeptidase in male reproductive system of rats and its age-related changes. **Andrologia**, Berlin, v.18, p. 610-617, 1986.

KONDRACKI, S.; IWANINA, M.; WYSOKIŃSKA, A.; HUSZNO, M. Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. **Acta Vet Brno**, Brno, v.81, p. 195-199, 2012.

KOPPERS, A.J.; REDDY, T.; O'BRYAN, M.K. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v.13, p.111-117, 2011.

KUMARESAN, A.; SIQUEIRA, A.P.; HOSSAIN, M.S.; BERGQVIST, A.S. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. **Cryobiology**, v.63, p.137-144, 2011.

LANGE-CONSIGLIO, A.; MEUCCI, A.; CREMONESI, F. Fluorescent multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extenders. **Open Veterinary Journal**, v.3, n.1, p.21-35, 2013.

LEAHY, T.; GADELLA, B.M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, p.7-13, 2011.

LI, R.; LI, Y.; FANG, X.; WANG, J.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. **Genome Research**, New York, v.19, n.6, p. 1124-1132, 2009.

LIN, C. **Candidate gene analysis for loci affecting sperm quality and fertility of boar**. 243f. Dissertation – University of Bonn, Bonn, 2005.



LIN, C.L.; PONSUKSILI, S.; THOLEN, E.; JENNEN, D.G.; SCHELLANDER, K.; WIMMERS, K. Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 92, p. 349–363, 2006.

LOPES, P.S.; FREITAS, R.T.F.; FERREIRA, A.S. **Melhoramento de suínos – Caderno Didático, 37**. Minas Gerais: Viçosa, 2001. 39 p.

LÓPEZ RODRÍGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN SOON, A.; MAES, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n.5, p. 63-66. , 2012.

LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; LAZURE, C.; MANJUNA, T.H.P. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1 / -A2 proteins, members of the BSP protein family. **Biology of Reproduction**, New York, v. 76, p. 424-432, 2007.

MARTIN-HIDALGO, D.; BRAGADO, M.J.; GARCIA-MARIN, L.J.; GIL, M.C. The effect of volume and sperm number on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17<sup>0</sup>C. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 7., 2011, Bonn, **Proceedings...**, Bonn, p.98-99.

MARTINEZ, F.A. **Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract**. Thesis - University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, 2005.

MASSÁNYI, P.; TRANDZIK, J.; NAD, P.; TOMAN, R.; SKALICKÁ, M.; KORÉNEKOVÁ, B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. **Asian Journal of Andrology**, New York, v. 5, p. 101-104, 2003.

MATOUSEK, J. Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 8, p. 1-40, 1985.

MAXWELL, W.M.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, Stoneham, v.48, 209-219, 1997.

MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.; BORTOLIN, R.C.; MENEZES, T.A.; VARGAS, A.R.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F.; BORTOLOZZO, F.P. Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, In Press, 2017.

NONNEMAN, D.J.; SCHNEIDER, J.F.; LENTS, C.A.; WIEDMANN, R.T.; VALLET, J.L.; ROHRER, G.A. Genome-wide association and identification of candidate genes for age at puberty in swine. **BMC Genetics**, London, v. 29, p. 17-50, 2016.

O'LEARY, S.; ARMSTRONG, D.T.; ROBERTSON, S.A.: Transforming growth factor-b (TGFb) in porcine seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 23, p. 748-758, 2011.

O'LEARY, S.; JASPER, M.J.; WARNES, G.M.; ARMSTRONG, D.T.; ROBERTSON, S.A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**, Cambridge, v.128, p. 237-247, 2004.

OH, S.A.; PARK, Y.J.; YOU, Y.A; MOHAMED, E.A.; PANG, M.G. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121, p.131-138, 2010.

OH, S.H.; SEE, M.T.; LONG, T.E.; GALVIN, J.M. Estimates of genetic correlations

between production and semen traits in boar. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 19, n. 2, p. 160-164, 2006.

ONTERU, S.K.; FAN, B.; DU, Z.-Q.; GARRICK, D.J.; STALDER, K.J.; ROTHSCCHILD, M.F. A whole-genome association study for pig reproductive traits. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, n. 1, p.18–26, 2012.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 5ª ed. FEPMVZ Editora, Belo Horizonte, 2008, 618p.

PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCÍA-CASADO, P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v.56, p. 387-398, 2001.

PÉREZ-LLANO, B.; YENES-GARCÍA, P.; GARCÍA-CASADO, P. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypo osmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, p. 1401-1407, 2003.

PEARSON, T.A.; MANOLIO, T.A. How to interpret a genome-wide association study. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.299, n.11, p.1335-1344, 2008.

PENÃ, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, R. Assessment of fresh and frozen–thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, p. 677-689, 2003.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; BRANDT, H.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v.64, p. 1766-1782, 2005.

PETRUNKINA, A.M.; WABERSKI, D.; GÜNZEL-APEL, A.R.; TÖPFER-PETERSEN, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduction**. Cambridge, v. 134, p. 3-17, 2007.

PETRUSKA, P.; CAPCAROVA, M.; SUTOVSKY, P. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. **Turkish Journal of Veterinary & Animal**, Ankara, v. 38, p. 643-652, 2014.

PINTO, A.P.G.; LOPES, P.S.; LOPES, M.S.; SILVA FILHO, M.I.; SOUSA, K.R.S.; CARNEIRO, P.L.S.; GUIMARÃES, S.E.F. Detecção de locos de características quantitativas nos cromossomos 9, 10 e 11 de suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n. 10, p. 2174-2181, 2010.

PONSUKSILI, S.; MURANI, E.; BRAND, B.; SCHWERIN, M.; WIMMERS, K. Integrating expression profiling and whole-genome association for dissection of fat traits in a porcine model. **Journal of Lipids Research**, Bethesda, v. 52, p. 668-678, 2011.

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

POWELL, S.R. The antioxidant properties of zinc. **Journal of Nutrition**, v. 130, p.1447S-1454S, 2000.

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

QIAN, L.; SUN, G.; ZHOU, B.; WANG, G.; SONG, J.; HE, H. Study on the relationship between different cytokines in the semen of infertility patients. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 66, p. 157–161, 2011.

R Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing** **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0, URL <http://wwwR-project.org.com>.

RAMOS, A.M.; DUIJVESTIJN, N.; KNOL, E.F.; MERKS, J.W.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, R.P.; GROENEN, M.A.; HARLIZIUS, B. The distal end of porcine chromosome 6p is involved in the regulation of skatole levels in boars. **BMC Genomics**, London, v. 12, p.35 – 42, 2011.

REIS, G.R. **Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético**. 112f. Tese - Doutorado em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RIBEIRO, C.V.; MORONI, J.L.; MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. The influence of air contact on the quality of extended boar semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 44, p.1-6.

ROBINSON, J.A.B; QUINTON, V.M. Genetic parameters of early neo-natal piglet survival and number of piglets born. In: 7<sup>th</sup> WORLD CONGRESS GENETICS APPLIED LIVESTOCK PRODUCTION, **Anais...** Montpellier, 2002.

ROCA, J.; VÁZQUEZ, J.M.; GIL, M.A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; MARTÍNEZ, E.A. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v.41, p.43-53, 2006.

ROCA, J.; PARRILLA, I.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; GIL, M.A.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.46, p.79-83, 2011.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; ESTRADA, E. Artificial insemination in boar reproduction. In BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. (eds) **Boar reproduction**. Springer, Berlin, pp. 589-608, 2013.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.39, p.141-146, 1995.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H.; ERIKSSON B. Evaluación del semen de verracoy su relación com fertilidad. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB, 3., 2000, Flores da Cunha, **Anais...** Flores da Cunha: MINITUB, p.13-33.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.38, p.312-318, 2003.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; IBORRA, A.; MARTÍNEZ, P.; CALVETE, J.J. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.10, p.491-497, 1998.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproduction Immunology**, New York, v. 66, n.1, p.11-22, 2011.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, E.A.; SANZ, L.; ROCA, J. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer introduces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. **Journal of Reproduction Immunology**, New York, v. 84, p.57-65, 2010.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; ROCA, J. PENÃ, F.J. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 1242-1250, 2008.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; WALLGREN, M. Advances in boar semen cryopreservation. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p.1-5, 2011.

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

SAMARDŽIJA, M.; DOBRANIÆ, T.; KRUŠLIN, S.; CERGOLJ, M.; KARADJOLE, M.; PRVANOVIÆ, N.; GRIZELJ, J. The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars, **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v.78, n.4, p.279-287, 2008.

SARAVIA, F.; NUNEZ-MARTINEZ, I.; MORÁN, J.M.; SOLER, C.; MURIEL, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; PENA F.J. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. **Theriogenology**. Stoneham, 68: 196-203, 2007.

SCHEID, I.R. **Manual de inseminação artificial de suínos**: procedimentos e métodos no laboratório. Concórdia: CNPSA/EMBRAPA, 1993, 48p.

SELIGMAN, J.; NEWTON, G.L.; FAHEY, R.C.; SHALGI, R.; KOSOWER, N.S. Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. **Journal of Andrology**, Copenhagen, v.26, p.629-637, 2005.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Current Conceptions, Pullman, Washington, 2.ed, p.368, 2003.

SESHADRI, S.; BATES, M.; VINCE, G.; JONES, D.I. The role of cytokine expression in different subgroups of subfertile men. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v.62, p. 275-282, 2009.

SEVERO, C.K.; PEREIRA, G.R.; PEREIRA, A.M.; ILHA, G.F.; OLIVEIRA, J.F.C.; SOARES, M.; ARRUDA, R.P.; GONÇALVES, P.B.D. Cysteine addition on short-term cooled boar semen preservation and its relationship with swine field fertility. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31, Supl. 1, p. 25-32, 2011.

SHARKEY, D.J.; MACPHERSON, A.M.; TREMELLEN, K.P.; MOTTERSHEAD, D.G.; GILCHRIST, R.B.; ROBERTSON, S.A. TGF- $\beta$  mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.189, p.1024–1035, 2012.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.684-687, 2015.

SIMMET, C.; RATH, D.; LORTON, S. Dose sedimentation of liquid boar semen influence semen quality during storage? **Proceedings of the 15<sup>th</sup> IPVS Congress**, Birmingham, England, v.3, p. 62, 1998.



SOUZA, F.F.; LOPES, M.D.; BICUDO, S.D. Constituintes do plasma seminal e suas interações com as células espermáticas. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.2, n.2, p.89-95, 1999.

STAHLBERG, R.; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p. 1365-1373, 2000.

STRZEŻEK, J., KORDA, W., GLOGOWSKI, J., WYSOCKI, P., BORKOWSKI, K. Influence of Semen-collection Frequency on Sperm Quality in Boars, with Special Reference to Biochemical Markers. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.30, n.2, p. 85-94, 1995.

SUTKEVICIENE, N.; ANDERSSON, M.A.; ZILINSKAS, H.; ANDERSSON, M. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, p. 739-747, 2005.

SUTOVSKY, P. New approaches to boar semen evaluation, processing and improvement, **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.50, Supp. 2, p.11-19, 2015.

TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, Berlin, v. 30, p. 217–24, 1998.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T. MACPHERSON, M.L.; PZOR, M.; BUHI, M.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.89, p.171-186, 2005.

TSAKMAKIDIS, I.A.; LYMBEROPOULOUS, A.G.; KHALIFA, T.A.A.

Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen.

**Journal of Veterinary Science**, Suwon, v.11, p.151-154, 2010.

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, p.1864-1871, 1998.

VAN GESTEL, R.A.; BREWINS, I.A.; ASHTON, P.R.; BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. Multiple proteins presente in purified porcine sperm apical plasma membranes Interact with the zona pelúcida on the oocyte. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.13, p. 445-454, 2007.

VADNAIS, M.L.; ALTHOUSE, G.C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v.76, p.1508-1516, 2011.

VADNAIS, M.L.; FOSTER, D.N.; ROBERTS, K.P. Molecular cloning and expression of the CRISP family of proteins in the boar. **Biology of Reproduction**, New York, v. 79, p. 1129–1134, 2008.

VADNAIS, M.L.; ROBERTS, K.P. Seminal plasma proteins inhibit in vitro and cooling-induced capacitation in boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.22, p.893-900, 2010.

VISSCHER, P.M.; BROWN, M.A.; MCCARTHY, M.I.; YANG, J. Five years of GWAS discovery. **The American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 90, n.1, p. 7-24, 2012.

VOLKER G. **Untersuchungen zur Verbesserung der In-vitro-Diagnostik von Eberspermien und Ermittlung der Beziehung zum Befruchtungserfolg.** [in German] - School of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, 2004.

XING, Y.; REN, J.; REN, D.; GUO, Y.; WU, Y.; YANG, G.; MAO, H.; BRENIG, B.; HUANG, L. A whole genome scanning for quantitative trait loci on traits related to sperm quality and ejaculation in pigs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 114 n. 1–3, p. 210–218, 2009.

XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTO, W.; FOXCROFT, G.R. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p. 3079-3089, 1998.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; CASAS, I.; BONET, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, Stoneham, v.79, p.929-939, 2013.

YESTE, M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, p. 71-79, 2015.

WABERSKI, D. Critical steps from semen collection to insemination. IN ANNUAL MEETING OF EU-AI-VETS, 2009, Ghent, **Proceedings**, Ghent, p. 66-69.

WABERSKI, D.; HELMS, D.; BEYERBACH, M.; WEITZE, K.F.; BOLLWEIN, H.; BLUEMIG, P.; WILLEKE, H.; ACEVEDO, N.; SAACKE, R.G. Sperm chromatin structure in boars used in artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, n.4, p. 257, 2002.

WABERSKI, D.; SCHAPMANN, E.; HENNING, H.; RIESENBECK, A.; BRANDT, H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, p.337-345, 2011.

WEITZE, K.F. Importance of boar semen motility and morphology for fertility. **International Pig Topics**, v. 27, n.5, 2012.

WEITZE, K.F. Novos conceitos na diluição do ejaculado suíno: Como as células espermáticas respondem aos desafios impostos? In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 7., 2012, Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: SINSUI, p. 17-30.

ZHANG, X.G.; YAH, G.J.; HONG, J.Y.; SU, Z.Z.; YANG, G.S.; LI, Q.W.; HU, J.H. Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17 °C. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.50, n. 2, p. 263-269, 2015.

ZHANG, H.; WANG, Z.; WANG, S.; LI, H. Progress of genome wide association study in domestic animals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v.4, n.1, 2012.

ZHAO, X., ZHAO, K., REN, J., ZHANG, F., JIANG, C., HONG, Y., JIANG, K., YANG, Q., WANG, C., DING, N., HUANG, L., ZHANG, Z., XING, Y. An imputation-based genome-wide association study on traits related to male reproduction in a White Duroc x Erhualian F2 population. **Animal Science Journal**, Oxford, v. 87, p.646-654, 2016.

**CAPÍTULO 2 - Head morphometry and chromatin instability in normal boar sperm  
and in sperm with cytoplasmic droplets**

**Artigo submetido e nas normas da revista “Animal Reproduction”**

**Head morphometry and chromatin instability in normal boar sperms and in sperms  
with cytoplasmic droplets**

TS Gaggini<sup>1\*</sup>; LO Rocha<sup>1</sup>; ET Souza<sup>1</sup>; FM de Rezende<sup>1</sup>; RC Antunes<sup>1</sup>; ME Beletti<sup>1</sup>

Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

\*Corresponding author: Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, 38400-902, [tsgaggini@yahoo.com.br](mailto:tsgaggini@yahoo.com.br).

Article type: Biotechnology

Running title: Morphometry and chromatin structure in boar sperm

**Abstract**

In boar studs, morphological analyses are used to evaluate boar and sperm quality and accordingly categorize them as either approved or rejected. Normally, morphological characteristics correlate with chromatin disorders, but studies to date have only considered the average of abnormalities and have not segregated cells as normal or abnormal. Therefore, the aim of this study was to assess if the presence of cytoplasmic droplets is associate with morphometric characteristics and chromatin instability of sperm heads. Morphological analyses were performed on semen from 11 boars using phase contrast microscopy (200 cells per sample). Normal cells and those with cytoplasmic droplets were differentiated and separately evaluated. A camera coupled microscope was used to photograph normal sperm (Group NOR, N=1,207) and those with proximal and distal

cytoplasmic droplets (Group DROP, N=725). Sperm head morphometry and chromatin structure were evaluated using the toluidine blue technique. Sperm heads in the DROP group were longer ( $8.37 \pm 0.60 \times 8.31 \pm 0.53$ ;  $p = 0.025$ ), less wide ( $4.16 \pm 0.21 \times 4.19 \pm 0.19$ ;  $p=0.03$ ), more symmetric on the sides ( $0.973 \pm 0.012 \times 0.971 \pm 0.011$ ;  $p=0.007$ ), had a higher ellipticity average ( $0.335 \pm 0.034 \times 0.329 \pm 0.031$ ;  $p=0.0004$ ), higher percentage of decondensed chromatin ( $2.71 \pm 3.87 \times 2.28 \pm 1.38$ ;  $p<0.0008$ ) and greater chromatin heterogeneity ( $4.66 \pm 1.40 \times 4.40 \pm 1.42$ ;  $p<0.0001$ ) than sperm heads of the NOR group. A higher frequency of semen collection results in less time for cell maturation and it probably affected the degree of chromatin condensation, cytoplasmic droplet migration and, consequently, the head morphometry measurements. In conclusion, the presence of cytoplasmic droplets is associated with morphometric characteristics, being this sperm heads longer and less wide than normal cells, and with chromatin instability, presenting higher percentage of decondensed chromatin and more heterogeneous chromatin than normal sperm.

**Keywords:** decondensed chromatin; cytoplasmic droplet; boar semen; morphology; morphometry.

## Introduction

During sperm maturation in the epididymis, cytoplasmic droplets migrate from the head to the tail, and they are released when sperm matures (Cooper and Yeung, 2003; Briz et al., 1995). Generally, in systems with intensive semen collection, immature sperm cells can be released in the ejaculate as the time for droplet migration is reduced; and an

important characteristic of such immature cells is the presence of proximal (PCD) and distal (DCD) cytoplasmic droplets in the sperm tail (Flowers, 2004).

Due to the concurrent development in the sperm head, mid-piece, and the tail (Gil et al., 2009), it has been hypothesized that the presence of cytoplasmic droplets is associated with head measurements and chromatin stability. Evaluations of sperm head morphometry have shown that some of these measurements correlate with female reproductive performance (Hirai et al., 2001), chromatin destabilization (Hingst et al., 1995; Karabinus et al., 1997), and with the presence of abnormalities in the ejaculate (Gaggini et al., 2015). However, the data proving this hypothesis are scarce; and the tests evaluating sperm head morphometry are not routinely performed in the field during semen evaluation.

In order to prevent the use of ejaculates with a high percentage of immature cells during the production of artificial insemination doses, morphological tests are performed in all boars monthly or every 50-60 days in boar studs. Ejaculates with more than 10% of the cells showing PCD are deemed unsuitable for this purpose (Feitsma, 2009). High percentage of DCD is not a cause for rejection but it also indicates immaturity of sperm (Saravia et al., 2007). Thus, avoiding the use of ejaculates with more than 10% PCD and DCD is interesting as the presence of cytoplasmic droplets is negatively correlated with pregnancy rate and litter size (Waberski et al., 1994).

Despite the importance of morphological tests, it is not possible to identify certain sperm alterations that are responsible for a reduction in fertilization rate or an increased embryonic mortality. Possible changes in chromatin compaction have been studied and are known to be one of the factors responsible for low male fertility or subfertility in humans (Liu and Backer, 1992; Spano et al., 2000; Bungum et al., 2004), boars (Boe-Hansen et al.,



2008) and specifically in bulls (Januskauskas et al., 2003; Khalil, 2004) even when sperm motility and morphology results are considered acceptable (Beletti and Mello, 1996).

While several studies have used samples from bulls and humans (Januskauskas et al., 2003; Bungum et al., 2004; Lucio et al., 2016), there are only few correlating sperm morphology and chromatin instability in swine (Saravia et al., 2007; Tsakmakidis et al., 2010). Further, many of the studies that correlated morphological data with chromatin instability did not distinguish normal cells and cells with cytoplasmic droplets; therefore, it is not possible to know if the presence of cytoplasmic droplets is related with chromatin instability. Thus, the aim of the study was to assess if cytoplasmic droplets is associate with morphometric characteristics and chromatin instability in sperm by separately analyzing normal cells and those with cytoplasmic droplets using the toluidine blue method.

## Materials and Methods

Only boars from the same genetic line (n=11, hybrid line – Pietrain x Large White x Landrace – from the same boar stud) were used in the study and one ejaculate was obtained from each animal. The average age of the animals on the day of sample collection was  $585 \pm 108.25$  days and the average of collection interval among them was  $5.59 \pm 1.80$  days. Collection interval average was defined as the average of the number of days between the last collection and the day of sample collection. All animals were given *ad libitum* access to water and fed 2.5 kg/d corn-soybean diet containing 0.55% digestible lysine and 3300 kcal metabolizable energy. Environmental temperature of the boar studs was controlled with a maximum of 22 °C.

Semen from the boars was collected using the glove-hand technique (Hancock and Hovel, 1959) in a pre-warmed (36 °C) plastic bag equipped with a filter to remove the gel

fraction and collect only the rich fraction. Ejaculates were evaluated macroscopically for color, aspect, temperature, volume and odor, and microscopically by subjective evaluation for sperm motility by the same technician. Only semen samples with a minimum of 85% motile cells were approved.

Semen samples that were approved in motility assessment were then prepared in Eppendorf tubes using an electronic mixing pipette such that 0.5 mL of semen was diluted with 2 mL of pre-warmed (36 °C) buffered formalin. These samples were used for the morphological examination, morphometric measurements, and chromatin instability evaluation. All samples were analyzed within 72 hours after semen collection.

The morphological examination was performed in a phase contrast microscope at 1000x magnification using an oil immersion lens. Two-hundred sperm cells from each sample were classified according to sperm morphology as normal, or with acrosome defect, abnormal head, neck defect, midpiece defect, folded tail, coiled tail, PCD, or DCD (Pursel et al., 1972). All samples used in the study presented at least one cytoplasmic droplet count.

The morphometric and chromatin instability examinations were performed following Beletti et al. (2005). Briefly, one droplet of each sample was smeared onto a glass slide, dried, hydrolyzed with 4 N HCl for 15 min, washed thrice with distilled water, dried, stained with one droplet of blue toluidine (0.025%, pH 4, in McIlvaine buffer), and covered with a cover slip after one minute. Pictures of sperm cells were acquired on a microscope (Leica DM500) coupled with a digital camera (Leica ICC50). Stained slides were photographed at 1000x magnification with oil immersion. Normal cells (NOR group) and cells with cytoplasmic droplets (DROP group) were photographed separately and the pictures of each animal and each group (NOR and DROP) were saved in different folders such that during analyses it was possible to see each cell from each boar and assess if the

cells were normal or had cytoplasmic droplets. The number of cells used per boar in NOR and DROP groups were defined by the number of cells available on the slide and the number of cells that had no overlap of other cells or of dirt.

Head segmentation was assessed by a semi-automatic method and was performed in 1,207 heads of the NOR group (average of  $109.72 \pm 38.74$  per boar with minimum value of 61 and maximum value of 162 heads) and 725 heads of the DROP group (average of  $68.63 \pm 56.99$  per boar with minimum value of 7 and maximum value of 161 heads). All heads were evaluated by using algorithms developed in the mathematical programming software Scilab (Beletti et al., 2005). The parameters evaluated were area, perimeter, width, length,

width to length ratio, ellipticity ( $e = (\text{length} - \text{width}) / (\text{length} + \text{width})$ , defined as elongation of the head contour, normalized to  $-1 < e < 1$ ), and shape factor

( $SF = (1 - e) \times \text{perimeter}^2 / 4\pi \times \text{area}$ ), defined as degree of deviation of the head contour from a smooth ellipse (Beletti and Costa, 2003). Side symmetry (the parameter that identifies asymmetries along the principal sperm axis) and anterior-posterior symmetry (the parameter that identifies asymmetry along the secondary sperm axis) were calculated by flipping the heads along their major and minor axis, filling the voids obtained by the orthogonal lattice representation of the head, and then identifying the intersection between the original and flipped areas (Beletti et al., 2005).

The algorithm also evaluated pixels of each head and selected 20 heads with minor standard deviation for each sample. Among these selected heads, the algorithm then selected six heads with the maximum average of pixel values (less stained heads) as these six heads theoretically represented the cells with the most compacted chromatin. The average values of these cells were considered as the default value for all heads of that

sample. Next, the algorithm calculated the difference between the default value and the value of each photographed head of the same sample and converted this difference to percentage values, thus, yielding the parameter percentage decondensed chromatin. The coefficient of variation for the gray scale intensity value of each head was also calculated, which represents the heterogeneity of chromatin condensation in the sperm head (Beletti et al., 2005).

All analyses were performed with the software Statistical Analysis System, version 9.1.3 (SAS Institute, 2005). All parameters were analysed using the General Linear Model (GLM) procedure considering individual boar effect and age at collection as covariates. Correlation test (CORR procedure) was used to evaluate the relationship among percentage of cytoplasmic droplets in ejaculate (obtained in morphological exam), morphometric and chromatin characteristics of cells. Determination coefficient was calculated as correlation coefficient squared. Differences were considered as significant at  $p < 0.05$ .

## Results

Sperm heads from the NOR group were wider than those in the DROP group ( $p = 0.030$ ), while DROP sperm heads were longer than NOR sperm heads ( $p = 0.025$ ). The higher width to length ratio of NOR sperm heads ( $p = 0.005$ ) further confirmed the observation that NOR heads were wider and shorter than DROP heads. Similarly, ellipticity results confirmed that DROP sperm heads were more elongated than NOR sperm heads ( $p = 0.0004$ ), and shape factor analysis also indicated that NOR sperm heads were more similar to an ellipse than DROP sperm heads ( $p = 0.018$ ; Table 1). DROP sperm heads were found to be more symmetric on the sides ( $p=0.007$ ), but did not presented differences in anterior-posterior symmetry ( $p=0.430$ ) when compared with NOR heads. Chromatin

heterogeneity and percentage decondensed chromatin were higher in the DROP group than in the NOR group ( $p < 0.001$  for both).

There was a significant correlation among percentage of decondensed chromatin, chromatin heterogeneity and all morphometric measurements except ante posterior symmetry and chromatin heterogeneity, as shown in Table 2. Chromatin heterogeneity was also correlated with percentage of decondensed chromatin and both parameters were significant correlated with percentage of cytoplasmic droplets.

## **Discussion**

The studies in other species have shown that variation in sperm morphology is a sensitive marker of chromatin abnormality and animal fertility (Hingst et al., 1995; Karabinus et al., 1997; Beletti et al., 2005). Thus, in the present study, normal sperm and sperm with cytoplasmic droplets were evaluated separately. To the best of our knowledge, this is the first report that has used such a comparison, and therefore, no literature is available for a meaningful discussion.

Nonetheless, the studies that have compared rejected and approved ejaculates based on sperm morphological examination have shown results similar to those reported here. Specifically, Martínez (2005), who used modified fluorescent microscopic sperm chromatin structure assay (SCSA) methodology to evaluate boar sperm chromatin stability, demonstrated a positive correlation ( $r = 0.44$ ;  $p = 0.01$ ) between decondensed chromatin and percentage of cytoplasmic droplets, and Fischer et al. (2003) also showed a positive correlation ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.001$ ) between DNA denaturation and the presence of cytoplasmic droplets in human sperm, using flow cytometry analysis of acridine orange treated spermatozoa as methodology. Further, Volker (2004) reported that when the

occurrence of cytoplasmic droplets is higher than 50% in boars, the presence of decondensed chromatin is greater than 5%; we however report a comparatively smaller but significant difference in the percentage of the decondensed chromatin. There are no defined limits for percentage decondensed chromatin, but previous reports have stipulated a limit of 5% (Wabersky et al., 2002; Volker, 2004; Martínez, 2005). We show that sperm from both NOR and DROP groups were within this limit, and it is important to bear in mind the differences in methodologies, genetic lines and species between our study and those in literature.

There are several methodologies that can be used to evaluate chromatin stability as SCSA, Feulgen test, single cell gel electrophoresis assay (Comet), terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL), acridine orange test, sperm chromatin dispersion test (SCD), aniline blue staining and toluidine blue staining (Erenpreiss et al., 2001; Bungum, 2012; Beletti, 2013). Although the differences in technique exist, the results obtained by these methodologies are moderately to strongly positively correlated among each other (Erenpreiss et al., 2001; Beletti and Mello, 2004; Erenpreiss et al., 2004; Bungum, 2012). Of these tests, SCSA is the most used (Beletti, 2013) but due its high cost the possibility of use in practice is reduced. Toluidine blue technique is considered easy and inexpensive (Beletti and Mello, 2004; Erenpreiss et al., 2004) and it was used for chromatin stability evaluation of many species including human (Erenpreiss et al., 2001; Beletti and Costa, 2003; Erenpreiss et al., 2004), rabbit (Beletti and Mello, 2004), bovine, caprine, ovine, canine (Beletti and Costa, 2003), fowl (Rodrigues et al., 2009), equine (Naves et al., 2004) and porcine (Arraztoa et al., 2016). Toluidine blue technique was chosen to be done in the present study due the possibility of evaluate

concomitantly sperm head morphology, morphometry and chromatin, as described by Beletti et al. (2005).

Although mostly of correlations were statistically significant, correlation ( $r$ ) and determination ( $R^2$ ) coefficient values were considered low and, for this reason, only the highest values were considered in discussion. Chromatin heterogeneity was correlated with the percentage of the decondensed chromatin, which indicates that cells with abnormal chromatin have greater heterogeneity in chromatin compaction within the sperm head. In agreement with the results reported by Beletti et al. (2005) in bulls, the correlations among chromatin heterogeneity, decondensed chromatin, and head morphometric measurements reported here indicate that chromatin condensation can be associated with sperm head morphometry without causing morphological abnormalities and, due the  $R^2$  value, other parameters could influence in this results too. The observed positive correlation between the percentage of cytoplasmic droplets and chromatin heterogeneity can also probably be explained by the immaturity of cells when they were ejaculated. An intensification of semen collection results in less time for cell maturation and this probably influence the completion of chromatin condensation (Yoseffi et al., 1994; Hingst et al., 1995; Golan et al., 1996) and cytoplasmic droplet migration (Flowers, 2004). Another important fact related to the presence of cytoplasmic droplets was explained by Gomez et al. (1996), who reported that the retention of droplets, mostly proximal droplets, is strongly correlated with the production of reactive oxygen species (ROS) in semen. ROS has been shown to affect sperm function in many different ways, which include impaired fertilization capacity and DNA integrity (Irvine et al., 2000; Aitken and De Iuliis, 2010; Aitken et al., 2013).

Previous studies (Hirai et al., 2001 – studied sperm of Pietrain boars using automated sperm morphometry analysis - ASMA; Saravia et al., 2007 – used ASMA and

ISAS® morphometric module to evaluate Duroc, Large White, Landrace and hybrid lines sperm; and Gil et al., 2009 – used ISAS® to evaluate Iberian boars sperm) have reported lower average head area ( $28.45 \mu\text{m}^2$  -  $36.20 \mu\text{m}^2$ ) than that reported in the present study, while Saravia et al. (2007) showed higher values for average head perimeter ( $26.00 \mu\text{m}$ ), width ( $4.50 \mu\text{m}$ ), length ( $9.00 \mu\text{m}$ ) and ellipticity (2.00). Similarly, Gil et al. (2009) reported greater values for head perimeter ( $22.35 \mu\text{m}$ ) and ellipticity (1.99) but lower values for head width ( $4.07 \mu\text{m}$ ) and length ( $8.11 \mu\text{m}$ ) than those reported here. Importantly, such differences in measurements are known to exist and it have been shown to be due to differences in the various boar lines used, according Saravia et al. (2007) and Kondracki et al. (2012), and in the techniques used, as described by Boersma et al. (1999) in their study using bulls. Therefore, we propose that morphometric data should be compared only when the same methodology for analysis is used and only between sperm samples from the same genetic line.

We found that the parameters ellipticity and shape factor are in agreement with values obtained for width and length, which show that the DROP group sperm heads were more elongated than those of the NOR group. Symmetry measurements are related to hydrodynamic properties of the cell and can, therefore, be used for identifying specific alterations in sperm heads, such as the pyriform head (Beletti and Costa, 2003). Given this, even though cells in the DROP group did not demonstrate head abnormalities, the average for side sperm head symmetry in this group were higher than the NOR group which implies that presence of droplets could be associated with head shape.

Very few studies have analyzed the effects of sperm head morphometric measurements on the reproductive performance of sows. Hirai et al. (2001) showed that sows inseminated with semen containing longer sperm heads had reduced farrowing rate,



and the cutoff value in this analysis was 86%. Even though the present study did not evaluate the effects of the presence of cytoplasmic droplets on the reproductive performance of sows, the results of the morphometric analyses were similar in both studies, i.e., longer sperm cells produced worse results. This similarity can be explained by the fact that there is a relationship between sperm head morphology and fertility potential. Accordingly, we show that cells with cytoplasmic droplets have longer heads, and this abnormality on morphological exam is generally negatively correlated with reproductive performance (Waberski et al., 1994; Benchaib et al., 2003; Feitsma et al., 2008; Feitsma, 2009; McPherson et al., 2014).

In conclusion, the presence of cytoplasmic droplets is associated with morphometric characteristics, being this sperm heads longer and less wide than normal cells, and with chromatin instability, presenting higher percentage of decondensed chromatin and more heterogeneous chromatin than normal sperm.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to CNPq and FAPEMIG and CAPES Brazilian agencies for financial support.

Table 1. Morphometric measurements, percentage of decondensed chromatin and chromatin heterogeneity of the boar sperm heads of normal sperm cells and sperm cells with proximal or distal cytoplasmic droplets (Mean  $\pm$  Standard Deviation).

| Variables                     | DROP              | NOR               | p       |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|---------|
| Number of cells               | 725               | 1207              |         |
| Head area, $\mu\text{m}^2$    | 44.81 $\pm$ 3.66  | 44.78 $\pm$ 3.54  | 0.897   |
| Head perimeter, $\mu\text{m}$ | 22.10 $\pm$ 1.29  | 22.06 $\pm$ 1.15  | 0.423   |
| Head width, $\mu\text{m}$     | 4.16 $\pm$ 0.21   | 4.19 $\pm$ 0.19   | 0.030   |
| Head length, $\mu\text{m}$    | 8.37 $\pm$ 0.60   | 8.31 $\pm$ 0.53   | 0.025   |
| Width:Length ratio            | 0.50 $\pm$ 0.04   | 0.51 $\pm$ 0.34   | 0.005   |
| Head ellipticity              | 0.335 $\pm$ 0.034 | 0.329 $\pm$ 0.031 | 0.0004  |
| Shape factor                  | 0.901 $\pm$ 0.039 | 0.906 $\pm$ 0.033 | 0.018   |
| Side symmetry                 | 0.973 $\pm$ 0.012 | 0.971 $\pm$ 0.011 | 0.007   |
| Anterior-posterior symmetry   | 0.959 $\pm$ 0.026 | 0.960 $\pm$ 0.022 | 0.430   |
| Decondensed chromatin, %      | 2.71 $\pm$ 3.87   | 2.28 $\pm$ 1.38   | 0.0008  |
| Chromatin heterogeneity, %    | 4.66 $\pm$ 1.40   | 4.40 $\pm$ 1.42   | <0.0001 |

NOR – heads of normal sperm cells (without abnormalities)

DROP – heads of sperm cells with proximal or distal cytoplasmic droplet

Table 2. Correlation among percentage of morphometric measurements and chromatin heterogeneity of boar sperm.

| Morphometric measurements | Decondensed chromatin |                    |         | Chromatin heterogeneity |                    |         |
|---------------------------|-----------------------|--------------------|---------|-------------------------|--------------------|---------|
|                           | r                     | R <sup>2</sup> (%) | p-value | r                       | R <sup>2</sup> (%) | p-value |
| Head area                 | 0.31                  | 9.61               | <0.0001 | 0.51                    | 26.01              | <0.0001 |
| Head perimeter            | 0.25                  | 6.25               | <0.0001 | 0.44                    | 16.36              | <0.0001 |
| Head width                | 0.23                  | 5.29               | <0.0001 | 0.38                    | 14.44              | <0.0001 |
| Head length               | 0.21                  | 4.41               | <0.0001 | 0.35                    | 12.25              | <0.0001 |
| Width to length ratio     | - 0.04                | 0.16               | 0.007   | - 0.09                  | 0.81               | <0.0001 |
| Ellipticity               | 0.05                  | 0.25               | 0.006   | 0.09                    | 0.81               | <0.0001 |
| Shape factor              | - 0.10                | 1.00               | <0.0001 | - 0.14                  | 1.96               | >0.0001 |
| Lateral symmetry          | 0.08                  | 0.64               | <0.0001 | 0.18                    | 3.24               | <0.0001 |
| Ante posterior symmetry   | 0.05                  | 0.25               | 0.002   | 0.01                    | 1.00               | 0.450   |
| Cytoplasmic droplets, %   | 0.06                  | 0.36               | 0.001   | 0.22                    | 4.84               | <0.0001 |
| Chromatin heterogeneity   | 0.35                  | 12.25              | <0.0001 | -                       | -                  | -       |

r = correlation coefficient values

R<sup>2</sup> = determination coefficient value

## References

- Aitken RJ, De Iuliss GN.** 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 16, 3–13.
- Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Iuliis GN.** 2013. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies, *Mol Hum Reprod*, 19, 475–485.
- Arraztoa CC, Miragaya MH, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta MC, Péndola CH, Neild DM.** 2016. Porcine sperm vetrification I: cryoloops method. *Androlog*, In Press.
- Beletti ME.** 2013. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Rev Bras Reprod Anim*, 37, 2, 92-96.
- Beletti ME, Costa LF.** 2003. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. *Anal Quant Cytol Histol*, 25, 97–107.
- Beletti ME, Costa LF, Guardieiro MM.** 2005. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz J Morphol Sci*, 22, 85–90.
- Beletti ME, Mello MLS.** 2004. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*, 62, 3-4, 298 – 402.
- Beletti ME, Mello MLS.** 1996. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA: protein complexes in bull spermatozoa. *Braz J Genet*, 19, 97–103.
- Benchaiib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF.** 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*, 18, 1023–1028.

- Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MBF, Hedeboe AM.** 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*, 69, 728–736.
- Boersma AA, Braun J, Stolla R.** 1999. Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls. *Reprod Dom Anim*, 34, 77–82.
- Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Camps R.** 1995. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl*, 16, 175–88.
- Bungum M.** 2012. Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility. *Obstet Gynecol Int*, 2012, p. 1-6.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A.** 2004. The predictive value of sperm chromatin assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod*, 19, 1401–1408.
- Cooper TG, Yeung CH.** 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Techniq*, 61, 28–38.
- Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J.** 2001. Comparative study of citochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl*, 22, 1, 45-53.
- Erenpreiss J, Jepson J, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M.** 2004. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*, 19, 10, 2277 – 2282.

**Feitsma H, Bergsma R, Leenhouwers JI, Knol EF.** 2008. Combining AI and Breeding Databases for Analysing the Relation between Boar Semen and Sow Fertility Variables. *Reprod Dom Anim*, 43, 57–58.

**Feitsma H.** 2009. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. *Acta Sci Vet*, 37, 61–71.

**Flowers WL.** 2004. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. In Abstracts of the Midwest Boar Stud Conference II, 2004, St Louis, USA, p.15–22.

**Fischer MA, Willis J, Zini A.** 2003. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology*, 61 (1), 207 – 211.

**Gaggini TS, Rocha LO, Moura TS, Antunes RC, Beletti ME.** 2015. Spermatic morphometry of boars approved and reproved in spermatic morphology test [In Portuguese]. In Abstracts of the XVII Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2015, Campinas, Brazil. Campinas: ABRAVES, p.448–450.

**Gil MC, García-Herreros M, Aparicio IM, Santos AJ, García-Marín LJ.** 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71, 254–263.

**Golan R, Cooper TG., Oschry Y, Oberpenning F, Schulze H, Shochat L, Lewin LM.** 1996. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod*, 11, 1457–1462.

**Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ.** 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*, 17, 276–287.

- Hancock JL, Hovel GLR.** 1959. The collection of boar semen. *Vet Rec*, 71, 664–665.
- Hingst O, Blottner S, Franz C.** 1995. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrology*, 27, 275–279.
- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, Braun J.** 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl*, 22, 104–10.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon E, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.** 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, 21 (1), 33 – 44.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H.** 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60, 743–758.
- Karabinus DS, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP.** (1997). Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *J Androl*, 18, 549–555.
- Khalil Y.** 2004. Binding capacity of bull spermatozoa to oviductal epithelium in vitro and its relationship to sperm chromatin stability, sperm volume regulation and fertility. Hanover, Germany: School of Veterinary Medicine Hannover. Thesis.
- Kondracki S, Iwanina M, Wysokińska A, Huszno M.** 2012. Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. *Acta Vet*, 81:195–199
- Liu DY, Baker HWG.** 1992. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril*, 58, 1178–1184.
- Lucio AC, Alves BG, Alves KA, Martins MC, Braga LS, Miglio L, Alves BG, Silva TH, Jacomini JO, Beletti ME.** Selected sperm traits are simultaneously altered after

scrotal heat stress and play specific roles in *in vitro* fertilization and embryonic development. *Theriogenology*, [In Press], 2016.

**Martinez FA.** 2005. Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract. Hannover, Germany: University of Veterinary Medicine Hannover. Thesis.

**McPherson FJ, Nielsen SG, Chenoweth PJ.** 2014. Semen effects on insemination outcomes in sows. *Anim Reprod Sci*, 151, 28–33.

**Naves CS, Beletti ME, Duarte MB, Vieira RC, Diniz EG, Jacomini JO.** 2004. Evaluation of equine spermatid chromatin with toluidine blue and acridine orange. *Biosci J*, 20, 3, 117 – 124.

**Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB.** 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci*, 34, 278–283.

**Rodrigues ACN, Rocha JV, Beletti ME.** 2009. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 61, 6, 1302 – 1307.

**Saravia F, Núñez-Martínez I, Morán JM, Soler C, Muriel A, Rodríguez-Martínez H, Penã FJ.** 2007. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*, 68, 196–203.

**SAS Institute.** 2005. SAS User's Guide, Release 9.1.3. SAS Institute, Cary, NC.

**Spano M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G.** 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril*, 73(1):43–50.

**Tsakmakidis IA, Lymberopoulos AG, Khalifa TA.** 2010. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J Vet Med Sci*, 11, 151–154.



**Volker G.** 2004. Untersuchungen zur Verbesserung der In-vitro-Diagnostik von Eberspermien und Ermittlung der Beziehung zum Befruchtungserfolg. [in German]. Hanover, Germany: School of Veterinary Medicine Hannover. Thesis.

**Waberski D, Helms D, Beyerbach M, Weitze KF, Bollwein H, Bluemig P, Willeke H, Acevedo N, Saacke RG.** 2002. Sperm chromatin structure in boars used in artificial insemination. *Reprod Dom Anim*, 37, 257.

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

**Yoseffi S, Oschry Y, Lewin LM.** 1994. Chromatin condensation in hamster sperm: a flow cytometric investigation. *Mol Reprod Dev*, 37, 93–98.

**CAPÍTULO 3 - Alta ocorrência de gota citoplasmática distal altera parâmetros  
relacionados ao movimento espermático de reprodutores suínos**

**Artigo submetido e nas normas da revista “Pesquisa Agropecuária  
Brasileira”**

**Alta ocorrência de gota citoplasmática distal altera parâmetros relacionados ao movimento espermático de reprodutores suínos**

Thais Schwarz Gaggini <sup>a\*</sup>, Helomar Barbosa <sup>b</sup>, Marcelo Emílio Beletti <sup>a</sup>, Fernanda Marcondes de Rezende <sup>a</sup> e Robson Carlos Antunes <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil – Rua Ceará s/n – bloco 2D – sala 03 – Campus Umuarama CEP 38400-902. E-mail: tsgaggini@yahoo.com.br, mebeletti@ufu.br, frezende@ufu.br, robson.antunes@ufu.br.

<sup>b</sup>Hypor Inc, Regina – SK, Canadá. 402 McDonald Street, Regina, Saskatchewan. E-mail: helomar.barbosa@hendrix-genetics.com.

**Resumo** - O objetivo da pesquisa foi comparar parâmetros relacionados ao movimento espermático de ejaculados aprovados e reprovados com alta ocorrência de gota citoplasmática distal. Foram selecionadas 169 amostras de morfologia espermática para serem utilizadas no estudo. Destas, 25 foram reprovadas devido à presença de mais de 10% de gota distal e 144 foram aprovadas em todos os parâmetros avaliados. A avaliação da morfologia espermática foi realizada, contabilizando 200 células por amostra, utilizando microscópio com aumento de 1000x. Considerou-se aprovado o ejaculado que apresentou, de forma cumulativa, menos de 20% de células anormais, menos de 5% de defeitos de cabeça, acrossoma, colo e peça intermediária e menos de 10% de alterações de cauda e presença de gota proximal e distal. Características da motilidade espermática avaliada pelo sistema computadorizado foram coletadas de todos os ejaculados avaliados no estudo. Ejaculados reprovados devido à alta ocorrência de gota distal apresentaram menor

velocidade em linha reta ( $p = 0,04$ ), menor motilidade total ( $p = 0,035$ ) e progressiva ( $p = 0,004$ ) quando comparados a ejaculados aprovados no exame morfológico. Os resultados indicam que a alta ocorrência de gota citoplasmática distal influencia nos parâmetros de movimento espermático de reprodutores suínos.

**Termos para indexação:** Ejaculado, morfologia espermática, motilidade espermática, *sus scrofa domesticus*.

### **High occurrence of distal cytoplasmic droplet changes spermatic movement parameters of boars**

**Abstract** – The aim of this study was to compare spermatic movement parameters of approved and reproved ejaculates due to high occurrence of distal cytoplasmic droplet. One-hundred-sixty-nine morphological samples were selected to be used in the study. Of these, 25 were rejected due to the presence of more than 10% of distal droplets and 144 were approved in all evaluated parameters. Morphological analyses were performed by counting 200 cells per sample using microscope with magnification of 1000x. Ejaculates that presented cumulatively less than 20% of abnormal cells, less than 5% of head defect, acrosome, neck and mid piece defect and less than 10% of tail abnormality and occurrence of proximal and distal droplets were considered approved. Information of sperm motility characteristics evaluated by computer system was collected of all ejaculates evaluated by morphological test. Rejected ejaculates due high occurrence of distal cytoplasmic droplets presented lower velocity straight line ( $p = 0.04$ ) and lower total ( $p = 0.035$ ) and progressive

( $p = 0.004$ ) motilities. These results indicate that high occurrence of distal droplets influence in spermatic movement parameters of boars.

**Index terms:** Ejaculate, sperm morphology, sperm motility, *sus scrofa domesticus*

## Introdução

A presença de espermatozoides morfologicamente anormais no ejaculado é um indicativo de não conformidade no processo de formação e maturação do espermatozoide ou ainda no processamento do ejaculado, preparação e armazenamento de doses inseminantes (Althouse, 1998). As alterações espermáticas ocasionadas durante a espermatogênese são denominadas alterações primárias - que consistem em defeitos de cabeça, acrossoma, colo, peça intermediária e cauda -, alterações secundárias são as que ocorrem no epidídimo – que consistem principalmente na presença de gota citoplasmática - e, as alterações terciárias são as iatrogênicas, causadas em casos de erro de preparação da amostra ou alterações nas condições ambientais, e são representadas por alterações na cauda, cabeça normal desprendida e acrossoma destacado (Bonet et al. 2012).

Em geral, as alterações primárias ocorrem em menor proporção quando comparadas às alterações secundárias e terciárias (Waberski et al. 1994), sendo as gotas citoplasmáticas comumente observadas durante a avaliação morfológica. Estas podem ser observadas em duas posições na peça intermediária e, dessa forma, classificadas como gota proximal, quando próxima do colo e da cabeça e, gota distal, quando presente na porção terminal da peça intermediária (Althouse, 1998). A gota citoplasmática distal é considerada menos importante do que a proximal (Althouse, 1998) em termos de comprometer os resultados

reprodutivos *in vivo* e *in vitro* e, por este motivo, diversos manuais técnicos, livros e estudos consideram esta alteração como sendo sem significado patológico, não indicando a reprovação de reprodutores que apresentarem alta ocorrência desta no exame morfológico (Fonseca et al. 1992; CBRA, 1998; Bortolozzo et al. 2005; Bonet et al. 2013). No entanto, estudos mais recentes indicam que a presença das gotas citoplasmáticas na peça intermediária pode causar aumento de tamanho e flexão da cauda (Fentic et al. 2006; Cooper et al. 2011) e, conseqüentemente alterar o movimento da célula espermática (Regan et al. 2012), reduzindo a sua capacidade fecundante. De forma geral, os estudos conduzidos referentes à importância das gotas citoplasmáticas abrangem os dois tipos de gotas de forma conjunta (Waberski et al. 1994; Regan et al. 2012), não identificando o efeito isolado da gota citoplasmática distal nos parâmetros relacionados ao ejaculado e a fertilidade do reprodutor. A fim de verificar se a reprovação do ejaculado devido à alta porcentagem de gota citoplasmática distal deve ser considerada em Centrais de Inseminação Artificial, o presente estudo comparou os parâmetros relacionados ao movimento espermático de ejaculados considerados aprovados e reprovados devido à alta ocorrência de gota citoplasmática distal no exame morfológico.

### **Material e Métodos**

Foram utilizados ejaculados de 132 reprodutores suínos de mesma linhagem genética (Duroc), sexualmente maduros, com idade média de  $15,93 \pm 6,49$  meses, intervalo de coleta médio de  $5,77 \pm 3,55$  dias, alojados na mesma Central de Inseminação Artificial (Greenhill AI Stud, Saskatchewan – Canadá) e submetidos ao mesmo manejo alimentar e de coleta de sêmen (método automatizado). Dos ejaculados coletados, 392 foram

submetidos à avaliação morfológica e destes, 169 foram utilizados no estudo, sendo que 144 foram considerados aprovados em todos os parâmetros avaliados e 25 foram reprovados exclusivamente devido à presença de mais de 10% de gota citoplasmática distal. As 223 amostras restantes não se encaixaram em nenhuma das duas formas de seleção para o estudo e por isso não foram utilizadas. As análises foram realizadas por um técnico de laboratório previamente treinado e adaptado à rotina de avaliações da Central de Inseminação Artificial, no período de outubro de 2015 e março de 2016.

Para a preparação da amostra de morfologia espermática, foi introduzida uma gota de ejaculado no momento do processamento do sêmen em 1 mL de formol citrato pré-aquecido à 36<sup>o</sup> C. Uma gota da amostra à temperatura ambiente foi colocada sobre lâmina e lamínula e sua avaliação foi realizada utilizando microscópio de contraste de fase, utilizando lente com 1000x de aumento e óleo de imersão. Duzentas células foram contadas e classificadas de acordo com a morfologia espermática: normal, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, cauda enrolada, cauda dobrada, cabeça anormal, defeito de acrossoma, defeito de peça intermediária e de colo. Os defeitos de cabeça, acrossoma, peça intermediária e colo foram considerados como defeitos primários e gota citoplasmática proximal e cauda foram considerados como defeitos secundários. Considerou-se aprovado o ejaculado que apresentou, de forma cumulativa, menos de 20% de células anormais, menos de 5% de defeitos de cabeça, acrossoma, colo e peça intermediária e menos de 10% de alterações de cauda e presença de gota citoplasmática proximal e distal.

Após a realização da morfologia espermática, dados referentes ao movimento espermático dos ejaculados avaliados foram coletados a partir do banco de dados de sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA, SpermVision®). Para a análise de

motilidade utilizando o sistema CASA, uma alíquota do ejaculado *in natura* previamente homogeneizada foi diluída em diluente BTS na proporção de 1:9 (90  $\mu$ L do ejaculado e 810  $\mu$ L de BTS pré-aquecido a 35 °C). A diluição foi feita em microtubos com 2mL de capacidade, utilizando pipeta eletrônica. Antes da realização da análise, o microtubo foi homogeneizado cinco vezes e 3  $\mu$ L foram introduzidos em câmara de contagem para análise de motilidade em sistema computadorizado pré-aquecida a 36 °C (Leja, 20  $\mu$ m profundidade, 4 câmaras de contagem), que foi preenchida por capilaridade. As amostras foram analisadas individualmente pelo sistema CASA, com 200x de aumento, utilizando oito campos por amostra, sendo a avaliação realizada na região central da câmara, seguindo em direção retilínea, de forma que os campos não se repetissem. As informações coletadas de cada ejaculado foram: motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva (deslocamento maior do que 4,5  $\mu$ m percorrido em linha reta), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), amplitude do deslocamento lateral da cabeça em relação à trajetória média (BCF – número de vezes que a cabeça cruza a direção do movimento), distância percorrida em linha reta (DSL), distância média percorrida (DAP), distância percorrida na trajetória real do espermatozoide (DCL), velocidade média percorrida (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade curvilínea (VCL – velocidade da trajetória real do espermatozoide).

Todos os parâmetros foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis porcentagem de gota distal, motilidade total, motilidade progressiva, DSL, VAP, VSL e VCL não apresentaram distribuição normal ( $p < 0,05$ ) e foram analisadas por meio de análise não paramétrica, utilizando o Teste de Wilcoxon. As variáveis ALH, BCF, DAP e DCL apresentaram distribuição normal ( $p > 0,05$ ) e foram analisadas utilizando o Teste T. As análises foram realizadas no programa estatístico



Action, versão 2.8 (Estatcamp, 2014). A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

As estatísticas descritivas de alterações morfológicas observadas nas amostras de sêmen dos grupos considerados aprovado e reprovado encontram-se na Tabela 1. Ejaculados reprovados no exame morfológico devido à presença de mais de 10% de gota distal apresentaram maior porcentagem de gota citoplasmática distal ( $p < 0,0001$ ), menor motilidade total ( $p = 0,035$ ), motilidade progressiva ( $p = 0,004$ ) e velocidade em linha reta - VSL ( $p = 0,04$ ) do que ejaculados aprovados no exame morfológico (Tabela 2).

A importância do estudo de parâmetros relacionados ao movimento espermático se deve ao fato de que a mobilidade do espermatozoide influencia na taxa de parto e no número de nascidos totais em suínos. O efeito do parâmetro motilidade total vem sendo estudado mesmo antes da utilização do sistema CASA (Flowers, 1997) e a importância deste parâmetro na fertilidade é bastante conhecido, sendo correlacionados positivamente (Vyt et al. 2008; Kummer et al. 2013; Broekhuijse et al. 2012; Lima et al. 2015; Flowers et al. 2016). As pesquisas utilizando a motilidade progressiva são mais recentes, porém, mostram que há uma correlação positiva desta variável com a taxa de parto (Broekhuijse et al. 2012), sendo um indicador importante de fertilidade de reprodutores (Kummer et al. 2013). Dessa forma, a influência negativa da gota distal na motilidade espermática total e progressiva *in natura* observada no presente estudo pode atuar como um fator indireto que cause redução no desempenho reprodutivo do plantel.

As variáveis relacionadas à velocidade e ao deslocamento das células espermáticas vêm sendo estudadas, mas não se sabe ao certo se todos os parâmetros obtidos pelo sistema

CASA estão envolvidos no processo de fecundação (Didion, 2008). As pesquisas envolvendo estes parâmetros apresentam resultados variáveis, porém, no geral observa-se efeito de VAP, VSL (Flowers et al. 2016), VCL, ALH e BCF na fertilidade (Holt et al. 1997; Broekhuijse et al. 2012; Kummer et al. 2013). No presente estudo, a maior ocorrência de gota distal não afetou os valores de VAP, VCL, ALH e BCF, mas diferiu nas amostras aprovadas para os valores de VSL quando comparado com amostras reprovadas.

A VSL das amostras reprovadas apresentou menor valor do que a aprovada, indicando que células de ejaculados normais percorreram em maior velocidade um percurso em linha reta do que as células de ejaculados reprovados por alta ocorrência de gota citoplasmática distal. Existem estudos que indicam que uma maior VSL tem relação com a maior taxa de concepção (Holt et al. 1997) e maior fertilidade do reprodutor (Flowers et al. 2016). No entanto, nem todos os estudos obtiveram a mesma correlação com a fertilidade, e a VSL pode não ter efeito sobre a fertilidade (Oh et al. 2010; Kummer et al. 2013), ou ainda, estar associada negativamente com tamanho de leitegada (Broekhuijse et al. 2012). Porém, sabendo-se que a gota citoplasmática pode causar alterações de movimento espermático (Regan et al. 2012), a menor velocidade percorrida em espermatozoides anômalos é um fenômeno justificável.

### **Conclusão**

A alta ocorrência de gota citoplasmática distal influencia em parâmetros relacionados ao movimento espermático de ejaculados de reprodutores suínos.

### **Referências**

- ALTHOUSE, G.C. Cytoplasmic droplets on boar sperm cells. **Swine Health and Production**, v. 6, n.3, p.128, 1998.
- BONET, S.; BRIZ, M.D.; YESTE, M. A Proper assessment of boar sperm function may not only require conventional analyses but also others focused on molecular markers of epididymal maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 52 – 64, 2012.
- BONET, S.; GARCIA, E. SEPÚLVEDA, L. The boar reproductive system. *In*: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. **Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 65-107.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F.M.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L. Exame do ejaculado. *In*: BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; BORCHARDT NETO, G. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 2005. p. 69 – 89.
- BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 779-789, 2012.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- COOPER, T.G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 130-138, 2011.
- DIDION, B.A. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. **Theriogenology**, v. 70, p. 1375-1376, 2008.
- ESTATCAMP. São Carlos: **Software Action**. Available in: <http://www.portalaction.com.br/>. Acesso em Junho 2015.
- FENTIC, S.; YEUNG, C.; SONNTAG, B.; NIESHLAG, E.; COOPER, T.G. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 294-301, 2006.
- FLOWERS, W.L.; DELLER, F.; STEWART, K.R. Use of heterospermic inseminations and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits and

seminal plasma proteins in boar fertility. **Animal Reproduction Science**, V. 174, p. 123-131, 2016.

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

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. Espermograma. *In*: FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. (eds). **Procedimento para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 1ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 1992. p. 6-30.

HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D.M.; REED, H.C.B.; CURNOCK, R.M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with outcomes of on-farm insemination: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 312-323, 1997.

KUMMER, A.B.H.P.; GAGGINI, T.S.; BERNARDI, M.L.; MCMANUS, C.; GONÇALES, E.M.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 747-754, 2013.

LIMA, D.M.A.; PINHO, R.O.; SIQUEIRA, J.B.; SHIOMI, H.H.; COSTA, E.V.; VERGARA, J.C.M.; CAMPOS, C.F.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Correlation of sperm parameters with fertility in two commercial pig lines. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-6, 2015.

OH, S.A.; PARK, Y.J.; YOU, Y.A.; MOHAMED, E.A.; PANG, M.G. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 131-138, 2010.

REGAN, A.K.; AGARWAL, A.; VAN DER LINDE, M.; DU PLESSIS, S.S. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1-8, 2012.

VYT, P. MAES, D.; QUINTEN, C.; RIJSSELAERE, T.; DELEY, W.; AERTS, M.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. **Flemic Veterinary**, v. 77, p. 291-298, 2008.

WABERSKI, F.; MEDING, S.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C. Fertility of long-termstored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 141-151, 1994.

**Tabela 1.** Anormalidade de células observadas no grupo aprovado e reprovado no exame morfológico de reprodutores suínos.

| Parâmetros          | Aprovado (%)               | Reprovado (%)                |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|
| morfológicos        | N = 147                    | N = 26                       |
| Defeito cabeça      | 0,00 - 4,00 (0,52 ± 0,74)  | 0,00 - 4,00(0,66 ± 1,15)     |
| Cauda enrolada      | 0,00 - 8,50 (0,34 ± 1,07)  | 0,00 - 3,00(0,34 ± 0,69)     |
| Cauda dobrada       | 0,00 - 10,00 (1,51 ± 2,16) | 0,00 - 9,00(2,82 ± 2,47)     |
| Defeito acrossoma   | 0,00 - 2,00 (0,09 ± 0,31)  | 0,00 - 2,00(0,24 ± 0,52)     |
| Gota distal         | 0,00 -10,00 (4,00 ± 2,66)  | 11,00 - 53,00 (20,34 ±11,43) |
| Gota proximal       | 0,00 - 10,00 (2,48 ± 2,57) | 0,00 - 8,00(2,92 ± 1,91)     |
| Defeito PI          | 0,00 - 2,00 (0,24 ± 0,49)  | 0,00 - 3,00(0,38 ± 0,69)     |
| Defeito colo        | 0,00 - 3,00 (0,11 ± 0,37)  | 0,00 - 2,00(0,14 ± 0,44)     |
| Total de alterações | 1,00 - 20,00 (9,32 ± 4,87) | 12,00 - 61,00(27,84 ± 13,31) |

PI = peça intermediária

Valores apresentados como mínima – máxima (média ± desvio padrão)

**Tabela 2.** Parâmetros espermáticos de ejaculados considerados aprovados e reprovados no exame morfológico.

| Parâmetros                        | Aprovado ( $\leq 10\%$ GD)     | Reprovado ( $> 10\%$ GD)       | p-valor    |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|
| GD (%)*                           | 0,00 - 3,25 - 10,00 (4,00)     | 11,00 - 15,00 - 53,00 (20,34)  | $< 0,0001$ |
| Mot Tot (%)*                      | 73,1 – 88,89 - 97,46 (88,18)   | 72,16 - 87,65 - 94,01 (85,87)  | 0,035      |
| Mot Prog (%)*                     | 48,56 - 78,55 - 91,40 (76,70)  | 45,72 - 70,24 - 86,88 (70,71)  | 0,004      |
| ALH ( $\mu\text{m}$ )**           | 2,82(0,51)                     | 2,90(0,64)                     | 0,63       |
| BCF (Hz)**                        | 26,18 (4,55)                   | 25,73 (5,05)                   | 0,15       |
| DAP ( $\mu\text{m}$ )**           | 26,17 (4,55)                   | 25,73 (5,04)                   | 0,75       |
| DCL ( $\mu\text{m}$ )**           | 42,65 (8,27)                   | 43,64 (9,65)**                 | 0,70       |
| DSL ( $\mu\text{m}$ )*            | 13,65 - 18,32 - 29,37 (19,06)  | 13,49 - 16,33 - 21,83 (17,67)  | 0,13       |
| VAP ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )* | 31,00 - 47,00 - 76,02 (47,72)  | 34,00 - 45,50 - 71,24 (48,27)  | 0,60       |
| VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )* | 40,57 - 62,70 - 126,74 (67,12) | 45,29 - 65,87 - 123,18 (74,94) | 0,42       |
| VSL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )* | 29,02 - 71,00 - 83,00 (62,42)  | 29,27 - 53,84 - 74,00 (53,29)  | 0,04       |

\* Valor apresentado como mínima – mediana – máxima (média) – comparação utilizando o Teste de Wilcoxon.

\*\* Valor apresentado como média (desvio padrão) – comparação utilizando o Teste T.

GD – Gota distal; Mot Tot – Motilidade espermática total; Mot Prog – Motilidade espermática progressiva; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF - amplitude do deslocamento lateral da cabeça em relação à trajetória média; DAP - distância média percorrida; DCL - distância percorrida na trajetória real do espermatozoide; DSL - distância percorrida em linha reta; VAP - velocidade média percorrida; VCL - velocidade curvilínea; VSL - velocidade em linha reta.

**CAPÍTULO 4 – Genome-wide association study and novel identification of candidate genes for sperm traits in Duroc boars**

**Artigo nas normas da revista “PLoS ONE”**



## Genome-wide association study and novel identification of candidate genes for sperm traits in Duroc boars

Thais S. Gaggini<sup>1\*</sup>, Helomar Barbosa<sup>2#a</sup>, Patrick Charagu<sup>2</sup>, Abe Huisman<sup>2</sup>, Marcelo Emílio Beletti<sup>1</sup>, Robson C. Antunes<sup>1#b</sup> and Fernanda M. de Rezende<sup>1</sup>

<sup>1, #b</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>2, #a</sup> Swine Department, Hypor Incorporation, Regina, Saskatchewan, Canada.

\* Corresponding author

E-mail: [tsgaggini@yahoo.com.br](mailto:tsgaggini@yahoo.com.br) (TSG)

### ABSTRACT

A genome-wide association study for ejaculate volume, sperm concentration, total and progressive motilities evaluated *in natura* semen of 113 Duroc boars was performed using genotypes of Illumina PorcineSNP60 BeadChip. The results were reported as the percentage of the additive genetic variance explained by the windows of 10 adjacent SNPs and the candidate genes in flanking regions about 0.1 Mb upstream and downstream of the window region were also checked. A total of 57 SNPs windows that explained more than 1% of genetic variance were identified for ejaculate volume (22), sperm concentration (14), total (10) motility and progressive (11) motility. Thirteen genes of eight SNPs windows were considered candidates for those traits. Gene *ABCC3* was related to volume, genes *KCNA3*, *RBM15* and *ITGB1* to sperm concentration, gene *WRNIP1* to total

motility, genes *FAM189A2*, *C9orf135*, *FXN* and *FAM83D* to progressive motility and genes *HSD17B11* and *HSD17B13* to both total and progressive motilities. The identification of these genes in pigs contributes to genomic knowledge of sperm traits expression and, in the future, this information could be used in boars' selection management, in order to include seminal quality information in breeding programs.

## INTRODUCTION

Macroscopic evaluations, as ejaculate volume, and microscopic exams, as sperm concentration and motility, are the most common analyses realized in boar studs to guarantee the high quality of semen' doses processed for artificial insemination purpose [1]. Volume and sperm concentration are evaluated to determine the total number of cells in *in natura* semen and the number of possible doses to be produced per ejaculate once they are related to the number of cells per dose and the dilution rate of the doses [2, 3]. Sperm motility indicates the percentage of mobile cells and, when using computer assisted sperm analysis (CASA), it can be differentiated in total motility and progressive motility, according with the trajectory and velocity of the cells [4]. In general, motility is positive correlated with *in vivo* fertility [5, 6, 7].

Usually, seminal analyses are not incorporated in boar breeding programs [8] due their low heritability [9]. However, the inclusion of seminal traits in boar selection for AI studs could enable an early and reliable selection using phenotypic aspects that are possible to be measured only in post-pubertal boars. In other words, when identified desirable genetic markers related to seminal traits it will be

possible to select fertile pre-pubertal boars even before the first semen assessment.

Single nucleotide polymorphism (SNP) has been used in genomic wide association studies (GWAS) with the aim of identifying regions and candidate genes that affect the expression of important traits [11, 12]. GWAS in pigs presented 37 SNPs of chromosome 1 and 6 associated with androstenone levels [13], 16 SNPs of chromosome 6 associated with skatole levels [14], both studies using Duroc sire line population, and, 28 regions in 11 chromosomes related with boar taint in commercial Landrace and Duroc breeds [15]. Body composition traits were also studied and five candidate genes were identified in commercial female pigs [16] and 663 genes were correlated with fat area in crossbred pigs [17]. Seventy-six SNPs were associated with feed intake behavior of Danish Duroc boars [18] and, for reproductive traits, thirty genes of nine chromosomes were considered candidates for number of total born, number of born alive, number of stillborn, number of mummified fetuses and gestation length in Large White and Large White x Landrace sows [19], two genes were candidates for age of puberty in crossbred gilts [20], one gene was candidate for sperm motility in Large White boars [21] and ten significant loci were identified for seven boar reproductive traits in White Duroc x Erhualian F2 intercross population [22].

Although GWAS related to sperm traits in boars have already been done, to our knowledge none of them have analyzed Duroc purebred population. It is known that swine domestication generated several differences among breeds related to reproduction and meat production [23, 24, 25] and the same alleles can be associated to different phenotypic traits [26]. Diniz et al. [21] have proved it

identifying the same SNPs in Landrace and Large White lines, but these SNPs were significantly associated to sperm motility only in Large White line. Considering that these breeds are phenotypically and genetically very similar between them and distinctly different from Duroc [27], Duroc boars probably will present different genetic information and because of it studies should be done specifically with this breed. In that way, the aim of the present study was to map genomic of regions and possible candidate genes that influence ejaculate volume, sperm concentration, total motility and progressive motility in purebred Duroc boars' population.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals and phenotype measurements

Repeated observations of volume, sperm concentration and total sperm motility and progressive sperm motility of *in natura* ejaculates of 113 Duroc boars housed at the same boar stud (Greenhill AI stud, Saskatchewan, Canada) were collected from February 2015 until May 2016. Automated semen collection system (Collectis<sup>®</sup>, IMV) was used and each ejaculate was collected in a pre-warmed (36<sup>o</sup>C) plastic container. Gel fraction of each ejaculate was filtered and discarded. After collection, the ejaculate was weighted and, to a better estimation of its real volume, it was assumed that one gram corresponds to one milliliter of semen. For microscopic evaluations, samples of ejaculates were prepared (90 µL of raw semen plus 810 µL of pre-warmed extender) and submitted to CASA system (Sperm Vision<sup>®</sup> Minitüb), which determined sperm concentration and total and

progressive motilities. Sperm concentration was determined through counting the cells in eight fields and establishing an average of them. Total motility corresponded to the percentage of mobile cells, independent of their trajectory, and progressive motility corresponded to progressive forward motility of the cells ( $>4.5$   $\mu\text{m}$  of distance sperm travels in straight line). It was evaluated 2,392 ejaculates and the number of ejaculates per boar was in average  $21.17 \pm 12.63$ . Boar's age at measurement, ejaculate volume, sperm concentration and total and progressive motilities mean values were considered for the analyses. The approval of ethics committee of Federal University of Uberlandia was not required because the protocols of semen collection used in AI stud routine were followed and the tissue for DNA extraction was collected during ear tags management. Both practices were done following Canada's Animal Welfare Code [28].

#### Genotyping and quality control

Boars were genotyped with Illumina PorcineSNP60 BeadChip [29], according to the manufacturer protocols (119 animals for 68,516 SNPs). Among the genotyped animals, 8 boars were not phenotyped. The quality control of markers was made excluding those with unknown genomic position, placed in sexual chromosomes, with minor allele frequency lower than 3% and markers and animals that presented call rate lower than 90%. After quality control, 113 animals and 42,240 SNPs remained to be analyzed. GWAS were realized by BLUPf90 [30] using weighted single-step GBLUP method (WssGBLUP, [31]), considering windows of 10 adjacent SNPs to estimate their effects by postGSf90 [32, 33]. A total of three rounds of BLUPf90 and postGSf90 were used for the WssGBLUP.

Each run of postGSf90 updated weights for SNPs, whereas each run of BLUPf90 used the updated weights to constructed G matrices [34]. In each round, the weights of SNPs with large effects were increased while those with small effects decreased.

The animal model considered as fixed effect boar's litter size (except for ejaculate volume), besides, as covariates, mean age at measurement (except for total motility) and mean value of sperm concentration (only for motility evaluations) and, as random effects, animal and residual effects. Analyses were performed using a pedigree composed by 250 animals of 96 dams and 49 sires. The single-step GBLUP method allows including in the same analysis animals that has different sources of information. In our case, there were 111 animals with records and genotypes (including 16 sires), two animals only phenotyped and eight only genotyped. The results of GWAS were reported as the percentage of the additive genetic variance explained by the windows of 10 adjacent SNPs presented in Manhattan plots drawn by R software.

#### Candidate genes based on GWAS results

Candidate genes were searched in the most important regions identified in GWAS analyses using Ensembl database (<http://www.ensembl.org/index.html>). Relation between ejaculate traits (ejaculate volume, sperm concentration and total and progressive sperm motilities) with the genes previously mapped in those regions was done searching in published literature. Genes located about 0.1 Mb upstream or downstream of the windows regions were also checked.

## RESULTS

Four phenotypic sperm traits associated with boar reproduction efficiency were measured in the present study. Descriptive statistics for these parameters are available in Table 1.

Table 1. Descriptive statistics for mean values of ejaculate volume, sperm concentration, total and progressive sperm motilities of Duroc boars used for GWAS analyses.

| <b>Semen traits</b>                | <b>N</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Range</b>   |
|------------------------------------|----------|-------------|-----------|----------------|
| Volume (mL)                        | 110      | 160.19      | 45.42     | 75.11 – 286.60 |
| Concentration ( $\times 10^6$ /mL) | 110      | 0.57        | 0.18      | 0.20– 1.11     |
| Total motility (%)                 | 113      | 86.53       | 7.47      | 50.45– 95.24   |
| Progressive motility (%)           | 110      | 76.52       | 9.99      | 38.21– 91.32   |

N – Number of animals evaluated; SD – Standard deviation

In Figures 1, 2, 3 and 4 were presenting the genomic regions and the percentage of genetic variance explained by windows of 10 adjacent SNPs by chromosome for ejaculate volume, sperm concentration, total and progressive sperm motilities, respectively.

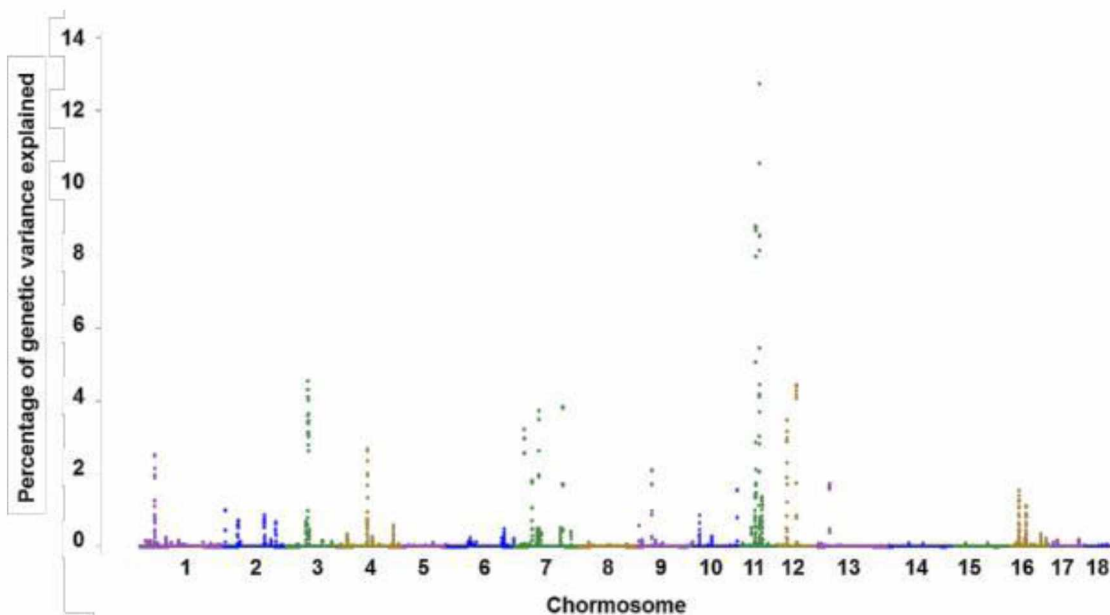


Figure 1. Manhattan plot of genomic regions associated with ejaculate volume.

SNPs of different chromosomes are denoted by different colours.

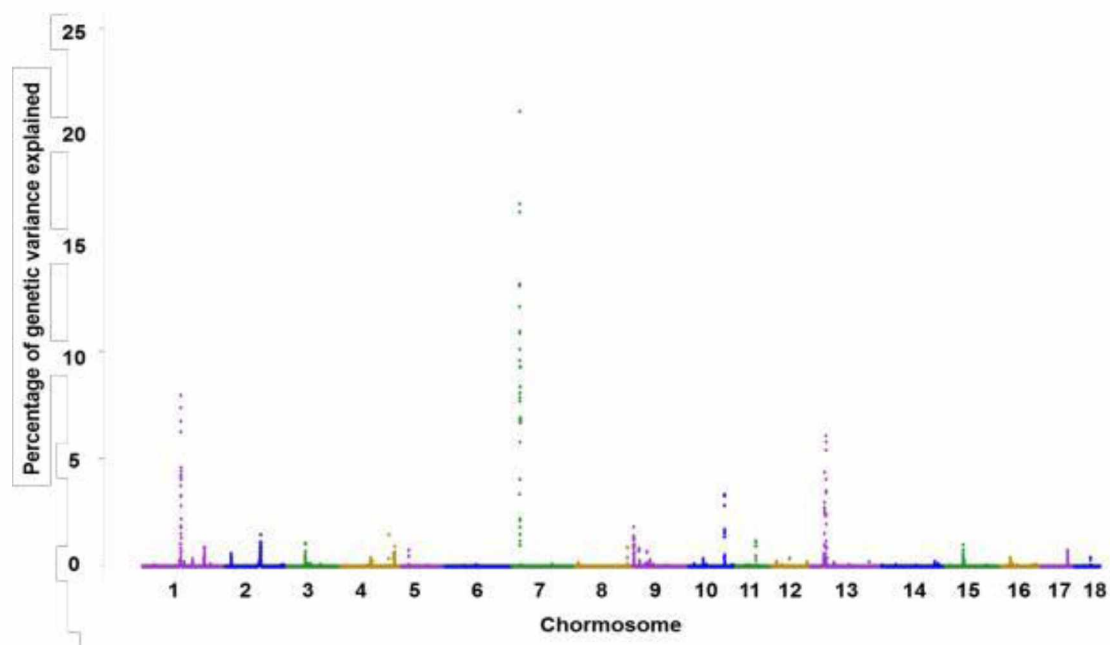


Figure 2. Manhattan plot of genomic regions associated with sperm concentration.

SNPs of different chromosomes are denoted by different colours.



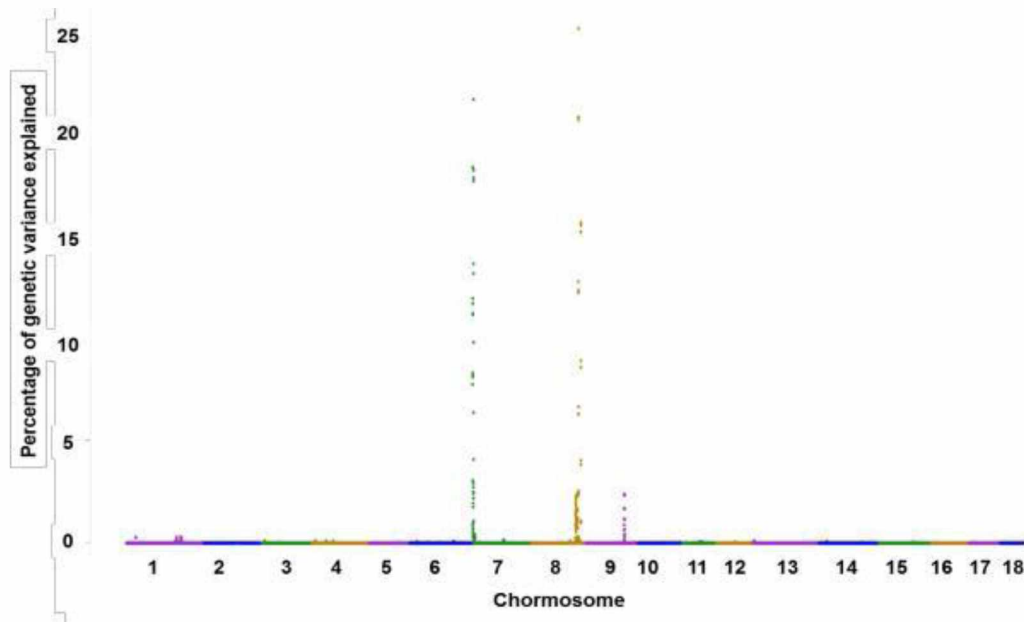


Figure 3. Manhattan plot of genomic regions associated with total motility. SNPs of different chromosomes are denoted by different colours.

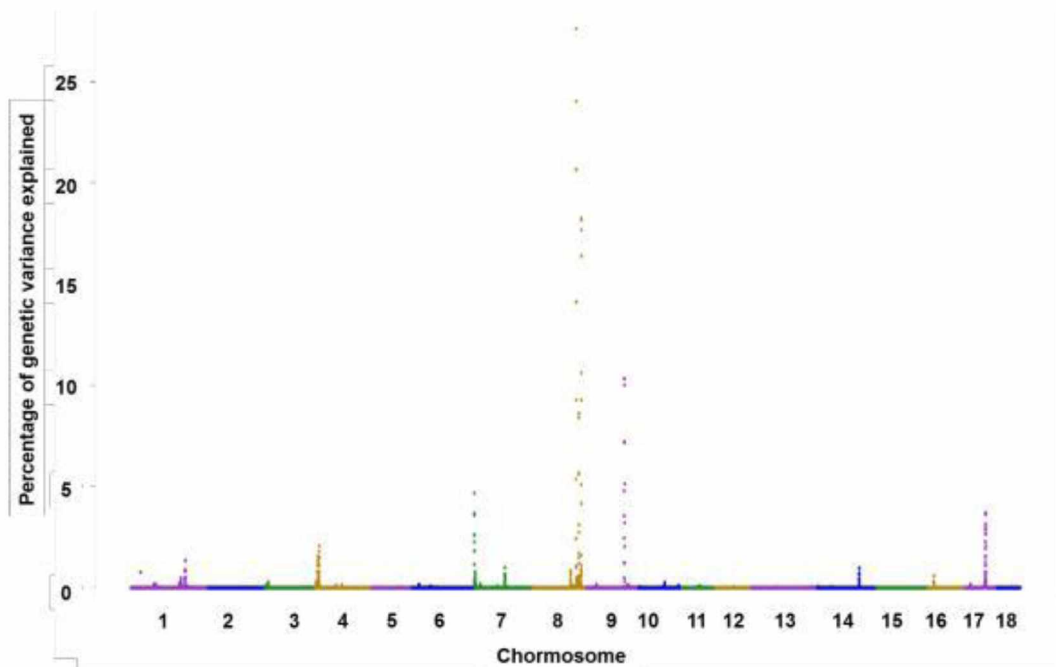


Figure 4. Manhattan plot of genomic regions associated with progressive motility. SNPs of different chromosomes are denoted by different colours.

Genes in windows regions that explained more than 1% of genetic variance of each semen trait are present in Table 2.

Table 2. Chromosome (C), location, additive genetic variance explained by the SNPs window (%<sup>2</sup>) and described genes in those regions for each semen trait.

| Trait  | C | Position (Mb)   | (%)  | Genes                                                                                                                                                                                                      |
|--------|---|-----------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Volume | 1 | 21.24 – 21.84   | 2.52 | <i>ADGB, RAB32, GRM1</i>                                                                                                                                                                                   |
|        | 2 | 1.48 – 1.97     | 1.00 | <i>*022123, *021469, *029328, *024158, *029868, *012869</i>                                                                                                                                                |
|        | 3 | 58.35 – 59.12   | 4.55 | <i>INPP4A, *027113, *022954, TMEM131, 7SK</i>                                                                                                                                                              |
|        |   |                 |      | <i>ZAP70, ANKRD23, ANKRD39, *008197, FAM178B, COX5B, CTR1B, CNNM3, *008199, *008202, *024746, *020750,</i>                                                                                                 |
|        | 3 | 59.22 – 59.99   | 4.02 | <i>*023617, *029057, *008205, RPIA, IGKC, IGKJ5, IGKJ4, IGKJ3, IGKJ2, IGKJ1, IGKV, *029427, IGKV-3, IGKV-5, IGKV-6, IGKV-7, U6</i>                                                                         |
|        | 4 | 59.52 – 60.70   | 2.67 | <i>CHMP4C, SNX16, PMP2, FABP5, PAG1</i>                                                                                                                                                                    |
|        | 7 | 9.59 – 99.54    | 3.22 | <i>*025580, PHACTR1</i>                                                                                                                                                                                    |
|        |   |                 |      | <i>*001105, *001138, CARMIL1, SCGN, HIST1H2AA, *023900, HIST1H2BA, SLC17A4, SLC17A1, *001132, *001132, *025307, HIST1H2BD, *021411, HIST1H1D, HIST1H3E, *021370, HIST1H2BC, HIST1H2AC, HMGNA4, *023119</i> |
|        | 7 | 39.71 – 40.48   | 3.74 | <i>KCNK5, KCNK17, *001594, DAAM2, *001596, *021735</i>                                                                                                                                                     |
|        | 7 | 106.60 – 107.10 | 3.84 | <i>POMT2, NGB, SPTLC2, ISM2, *029722, ADCK1, *002409</i>                                                                                                                                                   |

|      |    |                 |       |                                                                                                                                                        |
|------|----|-----------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Conc | 9  | 21.60 – 22.72   | 2.10  | <i>*023701, TMEM126B, TMEM126A, CREBZF, CCDC89, SYTL2, *014911, *014910, CCDC83, *014913, *014914, *022594, *014915, *021210, CCDC81, *014918, ME3</i> |
|      | 10 | 70.47 – 70.99   | 1.55  | <i>PRKCQ, PFKFB3, RBM17</i>                                                                                                                            |
|      | 11 | 25.83 – 26.24   | 8.81  | <i>*029837, *024244, *024683, *024707, RGCC</i>                                                                                                        |
|      | 11 | 27.15 – 28.06   | 2.11  | <i>No described genes</i>                                                                                                                              |
|      | 11 | 49.72 – 50.31   | 14.38 | <i>*009461, *028760, *009462</i>                                                                                                                       |
|      | 11 | 54.22 – 55.03   | 1.35  | <i>*009474, *009476, *009475, EDNRB, 7SK</i>                                                                                                           |
|      | 11 | 55.99 – 56.62   | 1.15  | <i>RBM26, NDFIP2, *020050</i>                                                                                                                          |
|      | 12 | 9.82 – 10.30    | 3.47  | <i>No described genes</i>                                                                                                                              |
|      | 12 | 27.03 – 27.77   | 4.43  | <i>*017590, <b>ABCC3</b>, ANKRD40, LUC7L3, *017556, *017559, WFIKKN2, TOB1, *023205, NME1, NME2, MBTD1, UTP18, CACNA1G</i>                             |
|      | 13 | 15.14 – 15.68   | 1.71  | <i>*011217, *011217, SLC4A7</i>                                                                                                                        |
|      | 16 | 16.03 – 16.73   | 1.54  | <i>U6</i>                                                                                                                                              |
|      | 16 | 24.44 – 28.51   | 1.11  | <i>PLCXD3, OXCT1, C5orf51, FBXO4</i>                                                                                                                   |
|      | 1  | 147.76 – 149.41 | 7.94  | <i>RASGRP1, FAM98B, FAM98B, SPRED1, TMCO5A, TMCO5A, U6, snoU13</i>                                                                                     |
|      | 1  | 150.74 – 153.47 | 4.59  | <i>*030384, ZNF770, *030003, *022186, *004802, ACTC1, GJD2, ARHGAP11A, SCG5, GREM1, FAM169B, *027431, *022814, *029748</i>                             |
|      | 2  | 117.05 – 117.70 | 1.46  | <i>*014188, *029552, *014190, 7SK</i>                                                                                                                  |
|      | 3  | 34.07 – 35.48   | 1.06  | <i>*028454, *021710, TMEM186, ABAT, USP7, CARHSP1, *021236, *007914, TMEM114, *007916, U6, U4, *019222</i>                                             |
|      | 4  | 119.76 –        | 1.46  | <i><b>KCNA3</b>, *006803, *006804, *006805,</i>                                                                                                        |

|              |        |                    |       |                                                                                              |
|--------------|--------|--------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | 120.33 |                    |       | *006806,<br>*022631, *006808, <b><u>RBM15</u></b> , *006810,<br>*006811, U6, SNORD112        |
|              | 7      | 8.22 – 8.63        | 26.03 | *001046, *001048                                                                             |
|              | 7      | 8.45 – 8.92        | 4.03  | *001048, *001047                                                                             |
|              | 7      | 8.73 – 9.09        | 9.28  | HIVEP1                                                                                       |
|              | 9      | 1.23 – 1.73        | 1.82  | LMO1, RIC3, TUB, *021486, *014587,<br>*028782, OR10A6                                        |
|              | 9      | 2.16 – 2.61        | 1.30  | *029801, *025459, *027999, OVCH2,<br>*028793, *025898, *023477, *029634,<br>*014598          |
|              | 10     | 61.39 – 61.71      | 3.33  | <b><u>ITGB1</u></b> , NRP1                                                                   |
|              | 11     | 55.35 – 56.16      | 1.18  | *025334, RNF219, RBM26, U6                                                                   |
|              | 13     | 19.65 – 20.12      | 4.36  | STT3B, OSBPL10                                                                               |
|              | 13     | 22.19 – 22.77      | 6.06  | ARPP21, U6                                                                                   |
| Total<br>Mot | 7      | 0.05 – 0.75        | 18.32 | *000990, *026101, *022727, *027047,<br>*027679, *021178, *023663, *030570,<br>EXOC2, SNORA70 |
|              | 7      | 1.20 – 1.71        | 1.93  | GMDS, MYLK4                                                                                  |
|              | 7      | 1.53 – 1.91        | 21.63 | MYLK4, <b><u>WRNIP1</u></b> , *020758, HMSD, *021201                                         |
|              | 8      | 133.43 –<br>134.07 | 2.25  | BMPR1B, *021874, *028240, SNORA50                                                            |
|              | 8      | 134.79 –<br>135.24 | 2.30  | ATOH1, *009197, *018676                                                                      |
|              | 8      | 136.05 –<br>136.47 | 2,38  | No described genes                                                                           |
|              | 8      | 136.62 –<br>137.14 | 1,21  | No described genes                                                                           |
|              | 8      | 137.93 –<br>138.30 | 25,1  | *022986, 7SK                                                                                 |

|             |    |                    |       |                                                                                                                                                                 |
|-------------|----|--------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prog<br>Mot | 8  | 140.50 –<br>141.15 | 15.63 | <i>MP1, DSPP, SPARCL1, NUDT9, <b><u>HSD17B11</u></b>,<br/><b><u>HSD17B13</u></b>, KLHL8 *023593, *009224,<br/>*009224, *024239</i>                              |
|             | 9  | 126.02 –<br>126.45 | 2.37  | <i>*030035, PIGC, *018758, *019027</i>                                                                                                                          |
|             | 1  | 248.67 –<br>250.10 | 1.32  | <i>*005247, <b><u>FAM189A2</u></b>, *005250, *005250,<br/><b><u>C9orf135</u></b>, PTAR1, *030142, *026693,<br/>MAMDC2, *026830, KLF9, <b><u>FXN</u></b>, U6</i> |
|             | 4  | 4.55 – 4.92        | 1.55  | <i>*031006</i>                                                                                                                                                  |
|             | 4  | 4.92 – 5.36        | 1.30  | <i>No described genes</i>                                                                                                                                       |
|             | 4  | 5.57 – 60.5        | 2.02  | <i>*024436</i>                                                                                                                                                  |
|             | 7  | 0.04 – 0.85        | 4.67  | <i>*000990, *026101, *022727, *027047,<br/>*027679, *021178, *023663, *030570,<br/>EXOC2, SNORA70</i>                                                           |
|             | 8  | 133.43 –<br>134.07 | 27.63 | <i>BMPR1B, *021874, *028240, SNORA50</i>                                                                                                                        |
|             | 8  | 137.77 –<br>138.24 | 8.61  | <i>*022986, 7SK</i>                                                                                                                                             |
|             | 8  | 140.50 –<br>141.15 | 18.24 | <i>DMP1, DSPP, SPARCL1, NUDT9,<br/><b><u>HSD17B11</u></b>, <b><u>HSD17B13</u></b>, KLHL8, *023593,<br/>*009224, *009224, *024239</i>                            |
|             | 9  | 125.82 –<br>126.45 | 10.33 | <i>*015484, *030035, PIGC, ssc-mir-214,<br/>*019027</i>                                                                                                         |
|             | 17 | 46.97 – 47.34      | 2.27  | <i>*007345, *007345, ADIG, *007347,<br/>SLC32A1, ACTR5, PPP1R16B</i>                                                                                            |
|             | 17 | 47.14 – 47.64      | 3.71  | <i>SLC32A1, ACTR5, PPP1R16B, <b><u>FAM83D</u></b>,<br/>DHX35</i>                                                                                                |

Conc = concentration; Tot Mot = total motility; Prog Mot = progressive motility  
 \*ENSSSCG000000 = Genes without associated name were identified by gene ID, using Ensembl nomenclature.

Genes written in bold and underlined were considered possible candidate genes for sperm trait.

## DISCUSSION

Considering that to our knowledge there is no research that conducted GWAS analyses in purebred Duroc boars for sperm traits, the discussion will be based in published literature of others boars' breeds and, even, other species.

Similarly to our results, Xing et al. [35] and Wimmers et al. [36], which evaluated White Duroc x Erhualian intercross and Pietrain / Pietrain x Hampshire crossbred boars respectively, also reported that chromosome 3 presents SNPs that affect ejaculate volume, but the location reported for them differed from our results. Despite that, none candidate gene was determined by us for this parameter in this chromosome. However, in chromosome 12, position 27.06 – 27.12 Mb, we identified the gene *ABCC3* as a candidate for ejaculate volume, disagreeing of [22] that did not detected significant SNPs or candidate genes in none chromosome for ejaculate volume of boars. *ABCC3* is member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter super-family responsible for encoded proteins that transport many substances, including amino acids, polysaccharides, peptides, lipids, drugs and toxins into the extra- and intracellular space [37]. The reason to consider this gene as a possible candidate to ejaculate volume is due that in humans it was identified in prostate and, recently, *ABCC3* was considered a predictor of prostate cancer [38]. Prostate is an accessory gland responsible for 20 – 30 % of seminal plasma content which is a large part of ejaculate volume [39]. Even so, the specific function of the encoded protein of *ABCC3* gene has not yet been determined and the real influence of this gene in seminal volume should be elucidated in the future.

Studies reported significant genomic regions in chromosome 7 influencing

sperm concentration, total sperm per ejaculate [22] and testicular weight [40] that are phenotypically correlated traits [41,42]. In the present study, three different regions of chromosome 7 explained more than 1 % of the additive genetic variance of sperm concentration. Although several genes were described in these regions, none of them have been related with this trait yet. Zhao et al. [22] reported the gene *TEP1*, placed in chromosome 7, position 83.53 – 83.56 Mb, affects sperm concentration, though SNPs windows described for us are situated distant from that gene (8.32 – 8.53 Mb; 8.55 – 8.82 Mb; 8.83 – 8.99 Mb).

Among the several genes located in different positions of nine chromosomes (Table 2), three of them can be considered as candidate for sperm concentration, *KCNA3*, *RBM15* and *ITGB*. *KCNA3* gene (also known as Kv1.3), located in chromosome 4, position 119.86 – 119.87 Mb, encodes potassium voltage-gated channel protein that have diverse functions, including regulate cell volume [43]. *KCNA3* is expressed in several organs, including testis [44], more specifically in the cytoplasm of primary spermatocytes and post-meiotic elongating spermatids [45], being important in spermatogenesis process. Several studies have shown that potassium participates in regulatory volume decrease of sperm cells [46, 47, 48, 49] and *KCNA3* probably acts rectifying potassium channel through the permeability of this ion on sperms [50].

*RBM15* gene, also located in chromosome 4, position 120.17 – 120.19 Mb, is related to transcription and post transcription regulation of genetic material [51, 52, 53]. Its expression showed to be critical for adequate development of spermatogenesis in humans due the high correlation of transcription process and the number of elongated spermatids in the seminiferous epithelium. This

correlation indicates that the reduction of *RBM15* transcription rate is related with spermatogenesis failure [54].

*ITGB1* gene, of chromosome 10, position 61.39 – 61.71 Mb, encodes a membrane receptor protein involved in cellular adhesion and recognition in diverse processes, participating of embryogenesis and spermatogenesis [55, 56]. *ITGB1* protein is presented in spermatogonia [57] and has an important role in migration process of embryos primordial germinative cells from intestine to gonads [58, 59]. Probably, an inadequate *ITGB1* action during embryogenesis could compromise spermatogenesis process for whole animal's life due the improper anatomic change of primordial cells and its effect on spermatogonia was not totally clarified.

Despite the high positive correlation previously reported between total motility and progressive motility [60], several chromosomes regions explaining more than 1% of their additive genetic variance and candidate genes identified differed between them (Table 2). However, some chromosomes and positions were similar and there were two equal candidate genes for both - *HSD17B11*, *HSD17B13*. A hypothesis of why this difference happened could be related with the sperm selection according their movement since progressive motility parameters consider only sperm which traveled more than 4.5  $\mu\text{m}$  of distance in straight line. In other words, sperm with more adequate function were select into this category.

*HSD17B11* and *HSD17B13* (chromosome 8, positions 140.71 – 140.75 Mb and 140.76 – 140.77 Mb, respectively) are related with testosterone biosynthesis [61], which is the spermatogenesis regulator hormone and is responsible for GnRH and LH feedbacks. Also, testosterone plays a crucial role in maintaining epididymal integrity and function. The sperm maturation is the most important function of this



organ and this process occurs during the transit of the cells through epididymal lumen. As the cells go through the different compartments of epididymis, they start to acquire motility and capacity to fertilize the oocyte [62, 63]. In that way, testosterone levels have already been positively correlated with sperm motility [64] and, probably proteins of *HSD17B11* and *HSD17B13* genes could influence in total and progressive motility.

Genomic regions related with total motility placed in chromosomes 1 [35, 21], 2 [22] and 8 [65] have been reported in literature. Based on present results, SNPs windows in chromosomes 7, 8 and 9 seem to be controlling the expression of this trait. The gene significantly associated with this characteristic in chromosome 8 for [65] was *GNRHR*, which is located (position 69.90 – 69.92 Mb) far from the location described in this research (positions between 133.43 and 141.15 Mb).

*WRNIP1* (chromosome 7, position 1.76 – 1.77 Mb) was considered a candidate gene for total motility. Its action could affect indirectly motility and other sperm functions since it stimulates the activity of DNA polymerase and it is required for maintaining genome integrity and stability [66, 67, 68]. The function of this gene is not totally elucidated, but it is known that failings in its expression can increase DNA damage in cells due its role on DNA post replication repair [66]. Besides that, *WRNIP1* gene acts in cellular cycle, mostly in S phase of DNA duplication and is also identified out of DNA replication site [69].

For our knowledge, there is no GWAS research published of progressive motility in literature. Significant genomic regions in chromosome 1 and two candidate genes *ESR1* ([35]; chromosome 1, position 16.54 – 16.91 Mb) and

*MTFMT* ([21]; chromosome 1 position 117.63 – 117.67 Mb) were reported affecting total motility, but no important regions were identified for us in this chromosome for this trait. However, three novel candidate genes in chromosome 1 were identified for progressive motility.

Genes *FXN*, *FAM189A2*, *C9orf135* belonging to the same SNP window (between 248.68 and 249.39 Mb) in chromosome 1 was detected for progressive motility. *FXN* gene encodes a protein (Fratxin) that participates in iron transport and metabolism in mitochondria [70] by forming Fe-S cluster [71, 72, 73]. Also, it is involved in many cellular functions as heme biosynthesis [74], respiratory regulation [75, 76], iron detoxification [77], iron storage [78] and oxidative stress protection [79]. It was identified in many tissues, including testis [70] and may be related to progressive motility since this trait results from oxidative phosphorylation and consequent ATP production that occurs in mitochondria. Another aspect is the role of *FXN* in the catalase activity, that has a heme group that is iron dependent, and is positive associated with sperm trait assessment, as rapid progressive motility and sperm viability [80, 81, 82].

There is little information about *FAM189A2*, but it was considered a candidate gene due its relation with XY Gonadal Dysgenesis in humans [83]. It is strongly expressed in epididymis, moderate expressed in other testicular cells and its relation with gonadal development could change sexual hormones production [83], influencing in sperm traits, as progressive motility. The knowledge about *C9orf135* is also limited in literature, but it is known that it is strongly expressed in testicles and it encodes a non-characterized protein related with fertility in humans [84]. However, both genes functions should be better understood and their real

relations with progressive motility need to be clarified.

The protein encoded by gene *FAM83D* (chromosome 17, position 47.14 – 47.64 Mb), also known as *C20orf129*, was identified in seminal plasma of subfertile stallions [85]. Proteins of the same family (*FAM83B*) were also related with men teratozoospermia [86] and were identified in seminal plasma of fertile men [87]. Although it is not clear the effect of this family in male reproduction, gene *FAM83D* was considered a candidate for progressive motility, since it was identified as a possible influencer for this trait.

This study presented important genomic regions and novel candidate genes associated with sperm quality traits of Duroc boars. A total of 57 SNPs windows that explained more than 1% of genetic variance were identified for ejaculate volume, sperm concentration, total and progressive motilities. Thirteen genes of eight SNPs windows were considered as candidates for those traits. The identification of these genes in pigs contributes to the genomic knowledge of their expression and, in the future, this information could be used in boars' selection management, in order to include seminal quality traits in breeding programs.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Luis Prieto Garcia for allowing the study was conducted in Hypor facilities and the staff in the GreenHill Artificial Insemination Stud, in special Ramon Martinez and Diana Ruiz, for their active contribution to obtaining boars' collection data. We also thank Abe Huisman, Pieter van As and Hypor biobank team for DNA samples and boars' information.

## REFERENCES

- [1] Robaire B Chan P. The handbook of andrology. Schaumburg: The American Society of Andrology; 2010.
- [2] Flowers WL. Semen evaluation, extension, packaging and transportation methods. AASV. 1996;1: 469-479.
- [3] Waberski D, Schapmann E, Henning H, Riesenbeck A, Brandt H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. Theriogenology. 2011;75: 337-345.
- [4] Broekhuijse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. J Anim Sci. 2012a;90: 779-789.
- [5] Broekhuijse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination centre a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. Theriogenology. 2012b;77: 1466-1479.
- [6] Kummer ABHP, Gaggini TS, Bernardi ML, Mcmanus C, Gonçalves EM, Wentz I. et al. Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology Reprod Domest Anim. 2013;48: 747-754.
- [7] Flowers WL, Deller F, Stewart KR. Use of heterospermic inseminations and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits and seminal plasma proteins in boar fertility. Anim Reprod Sci. 2016;174: 123-131.
- [8] Flowers WL. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. Theriogenology. 2008;70(8): 1297-1303.

- [9] Rothschild MF, Bidanel JP. Biology and genetics of reproduction. In: Rothschild, MF, Ruvinsky A. The genetics of the pig. CAB International: Wallingford; 1998. pp. 313–343.
- [10] Lopes OS, Freitas RTF, Ferreira AS. Melhoramento de suínos – Caderno Didático. Minas Gerais:Viçosa; 2001.
- [11] Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*; 2008;299(11): 1335-1344.
- [12] Zhang H, Wang Z, Wang S, Li H. Progress of genome wide association study in domestic animals. *J Anim Sci Biotechnol*. 2012;3(1): 26-26.
- [13] Duijvesteijn N, Knol EF, Merks JWM, Crooijmans RPMA, Groenen MAM, Bovenhuis H, et al. A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genomics*, 2010. doi:10.1186/1471-2156-11-42.
- [14] Ramos AM, Duijvesteijn N, Knol EF, Merks JW, Bovenhuis H, Crooijmans RP, et al. The distal end of porcine chromosome 6p is involved in the regulation of skatole levels in boars. *BMC Genomics*. 2011;12: 35-42.
- [15] Grindflek E, Lien S, Hamland H, Hansen MH, Kent M, Von Son M, et al. Large scale genome-wide association and LDLA mapping study identifies QTLs for boar taint and related sex steroids. *BMC Genomics*, 2011. doi:10.1186/1471-2164-12-362.
- [16] Fan B, Onteru SK, Du ZQ, Garrick DJ, Stalder KJ, Rothschild MF. Genome-wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs. *PLoS ONE*. 2011;6(2): 14726 2011.
- [17] Ponsuksili S, Murani E, Brand B, Schwerin M, Wimmers K. Integrating

expression profiling and whole-genome association for dissection of fat traits in a porcine model. *J Lipid Res.* 2011;52: 668-678.

[18] Do DN, Strathe AB, Ostersen T, Jensen J, Mark T, Kadarmideen HN. Genome-wide association study reveals genetic architecture of eating behavior in pigs and its implications for humans obesity by comparative mapping. *PLoS ONE.* 2013;8(8): e71509. doi:10.1371/journal.pone.0071509.

[19] Onteru SK, Fan B, Du Z-Q, Garrick DJ, Stalder KJ, Rothschild MF. A whole-genome association study for pig reproductive traits. *Anim Genet.* 2012;43(1): 18-26.

[20] Nonneman DJ, Schneider JF, Lents CA, Wiedmann RT, Vallet JL, Rohrer GA. Genome-wide association and identification of candidate genes for age at puberty in swine. *BMC Genomics.* 2016;29: 17-50.

[21] Diniz DB, Lopes MS, Broekhuijse MLWJ, Lopes, PS, Harlizius B, Guimarães SEF, et al. A genome-wide association study reveals a novel candidate gene for sperm motility in pigs. *Anim Reprod Sci.* 2014;151: 201-207.

[22] Zhao X, Zhao K, Ren J, Zhang F, Jiang C, Hong Y, et al. An imputation-based genome-wide association study on traits related to male reproduction in a White Duroc x Erhualian F2 population. *Anim Sci J.* 2016;87: 646-654.

[23] Amaral AJ, Ferretti L, Megens HJ, Crooijmans RPMA, Nie H, Ramos-Onsins SE, et al. Genome-wide footprints of pig domestication and selection revealed through massive parallel sequencing of pooled DNA. *PLoS ONE.* 2011 Apr 4. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014782>

[24] Gao Y, Zhang YH, Jiang H, Xiao SQ, Wang S, Sun GJ, et al. Detection of differentially expressed genes in the longissimus dorsi of northeastern indigenous

and large white pigs. *Genet Mol Res.* 2011;10(2): 779-791.

[25] Ojeda A, Ramons-Onsins SE, Marletta D, Huang LS, Folch JM, Pérez-Enciso M. Evolutionary study of a potential selection target region in the pig. *Heredity.* 2011;106(2): 330-338.

[26] Williams JL. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev –Off Int Epizoot.* 2005;24(1); 379–391.

[27] Kasimanickam V, Kastelic J. MicroRNA in sperm from Duroc Landrace and Yorkshire boars. *Sci Rep.* 2016;6: 1-11.

[28] National Farm Animal Care Concil (NFACC). Canada' Codes of Practice for the Care and Handling of Pigs. Available from:

<<http://www.nfacc.ca/codes-of-practice/pigs>> 2014 Accessed in mar. 2017.

[29] Ramos AM, Crooijmans RP, Affara NA, Amaral AJ, Achibald AL, Beever JE, et al. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS ONE.* 2009 Aug 5. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006524>.

[30] Misztal I, Tsuruta S, Strabel T, Auvray B, Drueta T, Lee D.H. BLUPF90 and related programs (BGF90). *Proceedings of 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.* 2002;28: 21. Available from: [nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=28-07.pdf](http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=28-07.pdf).

[31] Zhang X, Lourenco DAL, Misztal I, Aguilar I, Legarra A. Weighted single-step genomic BLUP: an iterative approach for accurate calculation of GEBV and GWAS. *Proceedings World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.* 2014;10. Available from: [http://www.academia.edu/14051284/Weighted\\_Single-step\\_Genomic\\_BLUP\\_an\\_Iterative\\_Approach\\_for\\_Accurate\\_Calculation\\_of\\_GEBV](http://www.academia.edu/14051284/Weighted_Single-step_Genomic_BLUP_an_Iterative_Approach_for_Accurate_Calculation_of_GEBV)

\_and\_GWAS.

[32] Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic full pedigree and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J Dairy Sci.* 2010;93: 743–752.

[33] Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir WM. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genet Res.* 2012;94: 73–83.

[34] Zhang XDAL, Lourenco I, Aguilar A, Legarra I, Misztal I. Weighting strategies for single-step genomic BLUP: an iterative approach for accurate calculation of GEBV and GWAS. *Front Genet.* 2016;7: 151. doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00151>.

[35] Xing Y, Ren J, Ren D, Guo Y, Wu Y, Yang G, et al. A whole genome scanning for quantitative trait loci on traits related to sperm quality and ejaculation in pigs. *Anim Reprod Sci.* 2009;114(1–3): 210–218.

[36] Wimmers K, Lin CL, Tholen E, Jennen DG, Schellander K, Ponsuksili S. Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. *Anim Genet.* 2005;36(2): 152-155.

[37] Morita M, Imanaka T. Peroxisomal ABC transporters: Structure function and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(9): 1387–1396.

[38] Karatas OF, Guzel E, Duz MB, Ittmann M, Ozen M. The Role of ATP-Binding Cassette Transporter Genes in the Progression of Prostate Cancer. *Prostate.* 2015 Dec 28. doi: DOI 10.1002/pros.23137.

[39] Cao Y-J, Caffo B, Choi L, Radebaugh CL, Fuchs EJ, Hendrix CW. Noninvasive quantitation of drug concentration in prostate and seminal vesicles:



improvement and validation with desipramine and aspirin. *J Clin Pharmacol.* 2008;48: 176–83.

[40] Ren DR, Ren J, Xing YY, Guo YM, Wu YB, Yang GC, et al. A genome scan for quantitative trait loci affecting male reproductive traits in a White Duroc x Chinese Erhualian resource population. *J Anim Sci.* 2009; 87: 17-23.

[41] Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste, M. Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends. Springer: Berlin, 2013.

[42] Jacyno E, Kawecka M, Pietruszka A, Sosnowska A. Phenotypic correlations of testes size with semen traits and the productive traits of boars. *Reprod Domest Anim.* 2015;50(6): 926-930.

[43] Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RK. Cell volume regulation: osmolytes osmolyte transport and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;148: 1- 80.

[44] González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, et al. K<sup>+</sup> channels: function-structural overview. *Compr Physiol.* 2012;2: 2087-2149.

[45] Jacob A, Hurley IR, Goodwin LO, Cooper GW, Benoff S. Molecular characterization of a voltage-gated potassium channel expressed in rat testis. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(4): 303–313.

[46] Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 1995;171(2):554–563.

[47] Petrunkina AM, Harrison RA, Hebel M, Weitze KF, Topfer-Petersen E. Role of quinine-sensitive ion channels in volume regulation in boar and bull spermatozoa. *Reproduction.* 2001;122(2):327–336.

- [48] Yeung CH, Cooper TG. Effects of the ion-channel blocker quinine on human sperm volume kinematics and mucus penetration and the involvement of potassium channels. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(9): 819–828.
- [49] Barfield JP, Yeung CH, Cooper TG. Characterization of potassium channels involved in volume regulation of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 2005;11(12):891-897.
- [50] Munoz-Garay C, De la Vega-Beltran JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol*. 2001;234(1): 261–274.
- [51] Hiriart E, Gruffat H, Buisson M, Mikaelian I, Keppler S, Meresse P, et al. Interaction of the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 with human Spen proteins SHARP, OTT1, and a novel member of the family, OTT3, links Spen proteins with splicing regulation and mRNA export. *J Biol Chem*. 2005;280: 36935–36945.
- [52] Lindtner S, Zolotukhin AS, Uranishi H, Bear J, Kulkarni V, Smulevitch S, et al. RNA-binding motif protein 15 binds to the RNA transport element RTE and provides a direct link to the NXF1 export pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(48): 36915–36928.
- [53] Uranishi H, Zolotukhin AS, Lindtner S, Warming S, Zhang GM, Bear J, et al. The RNA-binding Motif Protein 15B (RBM15B/OTT3) Acts as Cofactor of the Nuclear Export Receptor NXF1. *J Biol Chem*. 2009;284(38): 26106–26116.
- [54] Bonache S, Algaba F, Franco E, Bassas L, Larriba S. Altered gene expression signature of early stages of the germ line supports the pre-meiotic origin of human spermatogenic failure. *Andrology*. 2014;2: 596–606.

- [55] Anderson R, Fässler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, et al. Mouse primordial germ cells lacking  $\beta 1$  integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development*. 1999;126(8): 1655-1664.
- [56] Guan Y, Liang G, Martin GB, Guan LL. Functional changes in mRNA expression and alternative pre-mRNA splicing associated with the effects of nutrition on apoptosis and spermatogenesis in the adult testis. *BMC Genomics*. 2017 Jan 10. doi: 10.1186/s12864-016-3385-8.
- [57] Dyvia V, Kumar G, Nandi S, Ramchandra SG. Dynamics of spermatogenesis. *Annu Res Rev Biol*. 2014;4(1): 38-50.
- [58] Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 2003;130:4279–4286.
- [59] Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11: 37-49.
- [60] Ibanescu I, Rosca P, Crivei I, Sfartz I, Drugociu D. Correlations between some parameters of raw and stored semen in boar. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj Napoca*. 2015; 72(2):341-347.
- [61] Chai Z, Brereton P, Suzuki T, Sasano H, Obeyesekere V, Escher G, et al. 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology*. 2003;144:2084-2091.
- [62] Orgebin-Crist M-C, Danzo BJ, Davies J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Greep RO

Astwood EB eds. Handbook of Physiology Sec 7 Vol 5. Washington DC: American Physiological Society; 1975:319–338.

[63] Turner TT. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl.* 1995;16: 292–298.

[64] Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl.* 2007;28(3): 397-406

[65] Lin CL, Ponsuksili S, Tholen E, Jennen DG, Schellander K, Wimmers K. Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Anim Reprod Sci.* 2006;92: 349–363.

[66] Tsurimoto T, Shinozaki A, Yano M, Seki M, Enomoto T. Human Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) functions as a novel modulator for DNA polymerase delta. *Genes Cells.* 2005;10: 13-22.

[67] Hayashi T, Seki M, Inoue E, Yoshimura A, Kusa Y, Tada S, et al. Vertebrate WRNIP1 and BLM are required for efficient maintenance of genome stability. *Genes Genet Syst.* 2008;83(1): 95-100.

[68] Nomura H, Yoshimura A, Edo T, Kanno S, Tada S, Seki M, et al. WRNIP1 accumulates at laser light irradiated sites rapidly via its ubiquitinbinding zinc finger domain and independently from its ATPase domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417: 1145–1150.

[69] Crosetto N, Bienko M, Hibbert RG, Perica T, Ambrogio C, Kensche T, et al. Human Wrnip1 Is Localized in Replication Factories in a Ubiquitin-binding Zinc Finger-dependent Manner. *J Biol Chem.* 2008;283(50): 35173-35185.

[70] Hales KG. Iron testes: sperm mitochondria as a context for dissecting iron

metabolism. BMC Biol. 2010 Jun 21. doi: 10.1186/1741-7007-8-79.

[71] Muhlenhoff U, Ricchardt N, Ristow G, Lill R. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe-S proteins. Hum Mol Genet. 2002;11(17): 2025–2036.

[72] Chen OS, Hemenway S, Kaplan J. Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: Implications for mammalian iron homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(26): 16922-16927.

[73] Stehling O, Elsasser HP, Bruckel B, Muhlenhoff U, Lill R. Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. Hum Mol Genet. 2004;13: 3007–3015

[74] Lesuisse E, Santos R, Matzanke BF, Knight AS, Camadro JM, Dancis A. Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). Hum Mol Genet. 2003;12: 879–889.

[75] Gonzalez-Cabo P, Vazquez-Manrique RP, Garcia-Gimeno MA, Sanz P, Palau F. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. Hum Mol Genet. 2005;14(15):2091–2098.

[76] Sazanov LA, Hinchliffe P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from Thermus thermophilus. Science. 2006;311: 1430–1436.

[77] Gakh O, Park S, Liu G, Macomber L, Imlay JA, Ferreira GC, et al. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. Hum Mol Genet. 2006;15(3): 467–479.

[78] Cavadini P, O'Neill HA, Benada O, Isaya G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. Hum Mol Genet. 2002;11(3): 217–227.

- [79] Babcock M, Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, et al. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*. 1997;276: 1709–1712.
- [80] Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Lakota P, Szymański M, Wasilow K, Ludwikowski G, et al. Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma. *Biol Trace Elem Res*. 2011;143:167–77.
- [81] Eghbali M, Alavi-Shoushtari SM, Rezaii SA. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pak J Biol Sci*. 2008;11(15):1964–8.
- [82] Khosrowbeygi A, Zarghami N, Deldar Y. Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Iran J Reprod Med*. 2004;2: 58-64.
- [83] Norling A, Hirschberg AL, Iwarsson E, Persson B, Wedell A, Barbaro. Novel candidate genes for 46XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1 M array-CGH platform. *Eur J Med Genet*. 2013;56(12): 661-668.
- [84] Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Durairajanayagam D, Sabanegh E. Proteomic signatures of infertile men with clinical varicocele and their validation studies reveal mitochondrial dysfunction leading to infertility. *Asian J Androl*. 2016;18(2): 282–291.
- [85] Guasti PN, Souza FF, Scott C, Hartwig FP, Papa PM, Santos GAM, Freitas-Dellaqua CP, Papa FO. Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. *J Equine Vet Sci*. 2014;32(1): 84 – 85.
- [86] Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY, Quintana S, Diamond MP, Strader LF, Krawetz SA. Success and failure in

human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet.* 2007;16(7): 763 – 773.

[87] Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, Marinis L, Castagnola M, Marana R. Proteomic approach in the indentification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fert Stert.* 2012;97(1): 67 – 73.