

## Intervalos de coletas de sêmen em reprodutores suínos no início da vida reprodutiva: avaliação dos parâmetros seminais

Intervals of Semen Collection from Boars during Early Reproductive Life: Evaluation of Seminal Fluid Parameters

Julianni Dornelles<sup>1</sup>, Carlos Augusto Rigon Rossi<sup>1</sup>, Luara Medianeira de Lima Schlösser<sup>1</sup>, Rodrigo Dalmina Rech<sup>1</sup>, Cristian Guilherme Gräf<sup>2</sup>, Cíntia Melazzo de Andrade<sup>1</sup>, Marcelo Soares<sup>3</sup>, Marcos Speroni Ceron<sup>4</sup> & Jovani Patias<sup>5</sup>

### ABSTRACT

**Background:** In swine production, good reproduction rates can be achieved through genetic selection and reproductive biotechnologies. One of these biotechnologies is artificial insemination, which contributes to disseminate genes and optimize breeding boars, thus improving the quality of insemination doses. This study focused on evaluating the intervals between semen collection from boars at the beginning of their reproductive maturity vis-à-vis the viability of insemination doses.

**Materials, Methods & Results:** Twenty 9-month-old boars of the genetic lineage AGPIC 337 (Agroceres PIC) were used in this study. The experimental design used here was completely randomized, and the randomly selected males were divided into four treatment groups, which were named according to the interval between semen sample collections: T1: 2 days; T2: 3 days; T3: 4 days and T4: 7 days. Each treatment comprised 5 animals, and at the end of the 90 days of this study, a total of 150 ejaculates were obtained in T1, 110 in T2, 90 in T3 and 60 in T4. The values of total motility, volume and sperm concentration of the ejaculates were evaluated, as was oxidative stress by means of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the latter after 0, 72, 120 and 168 h of the study. Membrane integrity was evaluated at 0, 72, 120 and 168 h using the eosin-nigrosin staining procedure. Sperm heat resistance was tested after 120 h, and sperm morphology after 72, 120 and 168 h. Sperm concentrations differed, with T3 showing 27.04% and 29.65% higher concentrations ( $P < 0.05$ ) than groups T2 and T1, respectively. Total motility in group T4 was 0.56%, 1.98% and 3.28% higher ( $P < 0.05$ ) than in T3, T2 and T1, respectively, indicating that the 7-day interval produced the best result. The heat resistance test showed the expected results, i.e., T2 and T4 did not differ in terms of total motility, but that of T4 was 4.96% higher ( $P < 0.05$ ) than T3 and 7.71% higher than T1. As for plasma membrane integrity, T4 had 6.45%, 8.09% and 12.72% more cells with intact membranes ( $P < 0.05$ ) than T3, T2 and T1, respectively. With regard to TBARS, group T1 showed higher concentrations ( $P < 0.05$ ) than T2 (6.18%), T3 (11.13%) and T4 (9.12%), i.e., the sperm cells in the animals of T1 showed greater changes. As for sperm morphology, the number of intact cells in T4 was 6.08%, 7.53% and 12.44% higher ( $P < 0.05$ ) than in T3, T2 and T1, respectively.

**Discussion:** With respect to total motility, other authors have reported similar results, i.e., the motility of sperm was highest when collected at 7-day intervals and lower when collected at shorter intervals. Despite the statistical differences between treatments, these results were found to be similar to those recommended in the literature for use in the preparation of insemination doses. Thus, we suggest that all the intervals between collections can be used in the routine of semen production centers, since the minimum requirement for an ejaculate to be accepted in an artificial insemination program is to have a total motility of no less than 70 percent. At the beginning of their reproductive maturity, boars may be subjected to intervals between collections of at least 2 days, without impairing the total motility of insemination doses. However, the best results are obtained when semen is collected at 7-day intervals, which ensures higher total motility, morphologically healthy cells with intact membranes, and less oxidative damage caused by lipid peroxidation.

**Keywords:** insemination doses, semen, intervals between collections.

**Descritores:** doses inseminantes, sêmen, intervalo entre coletas.

DOI: 10.22456/1679-9216.98315

Received: 15 August 2019

Accepted: 29 November 2019

Published: 13 December 2019

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), <sup>2</sup>Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) & <sup>3</sup>Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário (HVU-UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. <sup>4</sup>Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brazil. <sup>5</sup>Faculdade de Direito de Santa Maria (FADISMA), Santa Maria. CORRESPONDENCE: C.A.R. Rossi [carlos.rossi.mv@gmail.com]. Departamento de Clínica de Grandes Animais - UFSM. Av. Roraima n° 1000. Campus Universitário. CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

## INTRODUÇÃO

Na atividade suinícola, bons índices reprodutivos podem ser alcançados através da seleção genética e das biotecnologias da reprodução. A inseminação artificial (AI) é uma dessas biotecnologias que contribui com a difusão de genes, com a otimização de reprodutores e com a elaboração de doses inseminantes (DIs) de qualidade [8]. Nesse sentido, as avaliações do ejaculado são relevantes para monitorar a durabilidade das DIs e ainda permitem classificar os animais de descarte do rebanho de reprodutores. O índice de reposição em uma Central de Produção de Sêmen (CPS) supera a faixa dos 80% do plantel, tendo como principal objetivo a constante atualização genética [13]. A permanência curta nas CPS faz com que as empresas exijam ao máximo a capacidade reprodutiva dos cachorros, ou seja, buscam a precocidade na atividade reprodutiva dos machos e a redução dos intervalos entre as coletas de sêmen [11].

Por outro lado, um ejaculado de qualidade é influenciado por diversos fatores extrínsecos e intrínsecos, onde a frequência de coletas pode refletir diretamente na espermatogênese [11]. Nesse sentido, as informações relacionadas a frequência de coletas de sêmen em machos no início da vida reprodutiva, bem como a possibilidade de reduzir o intervalo entre coletas são incipientes e pouco conclusivas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os intervalos entre as coletas de sêmen de suínos, no início da vida reprodutiva, em relação à viabilidade de doses inseminantes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Local do estudo*

O estudo foi realizado no período de janeiro a abril de 2018, na Central de Produção de Sêmen (CPS) da empresa Bretanha Importação e Exportação Ltda, localizada no município de São Carlos, oeste do estado de Santa Catarina, com altitude média de 264 metros, Latitude 27° 04' 39" Sul e Longitude 53° 00' 14" Oeste. A empresa possuía 150 machos reprodutores suínos em serviço.

### *Chegada dos animais na Central*

Os reprodutores chegaram na CPS por volta do oitavo mês de vida, onde foram submetidos ao processo de quarentena e condicionamento para monta em manequins. Neste período também foram executadas as análises laboratoriais dos primeiros ejaculados, para certificar-se do momento em que pudessem ser introduzidos à rotina normal da central. Nas avaliações foram

considerados os padrões citados na literatura quanto a motilidade total (MT) mínima de 70% e máximo de 20% de defeitos morfológicos [5].

### *Animais utilizados e delineamento experimental*

Utilizou-se para o estudo 20 animais, selecionados conforme critérios citados a cima, da genética Agroceres PIC (AGPIC 337) com 9 meses de idade, alimentados com ração comercial para machos reprodutores, fornecida na porção de 2,4 kg/animal/dia (3.200 kcal kg<sup>-1</sup> de energia metabolizável, 16% de PB e 7.500 mg kg<sup>-1</sup> de lisina). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os machos selecionados aleatoriamente, distribuídos em quatro tratamentos, estes nomeados de acordo com o período de intervalo entre coletas: T1- 2 dias; T2- 3 dias; T3- 4 dias e T4- 7 dias. Cada tratamento contemplou 5 animais e ao final dos 90 dias de estudo obteve-se 150 ejaculados totais no T1, 110 no T2, 90 no T3 e 60 no T4. Para a análise estatística utilizou-se a média de cada tratamento, e não o mesmo número de ejaculados.

### *Análises executadas*

Os ejaculados foram obtidos por método semi-automático durante a rotina da granja, pela manhã. Após a coleta da fração rica, o ejaculado foi pesado e analisado a partir de uma diluição inicial de 1:9 (900 µL de diluente e 100 µL de sêmen), em microtubo tipo *ependorf*, quanto à motilidade e concentração de espermatozoides, pelo sistema automatizado de análise seminal CASA<sup>1</sup> (Computer Assisted Spem Analysis), utilizando câmaras de contagem espermática<sup>1</sup>. A câmara foi preenchida por capilaridade com 3 µL da amostra e analisada em microscópio óptico sob objetiva de 20x e contraste de fase negativo. A partir disso foram elaboradas as DIs com o diluente Vitassen LD<sup>1</sup>, de modo a conter 1,5 × 10<sup>9</sup> espermatozoides por DI de 45 mL e, posteriormente, armazenadas em conservadora sob temperatura de 17 graus Celsius. Avaliou-se as DIs quanto a MT nas horas 0, 24, 72, 120 e 168 do estudo.

O estresse oxidativo foi avaliado por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito na literatura, em busca de metabólitos da peroxidação lipídica celular, nas horas 0, 72, 120 e 168 [7]. Para a integridade de membrana aplicou-se a metodologia de coloração eosina-nigrosina, de acordo com a literatura, sugerindo como membrana lesada as células que apresentaram seu interstício pigmentado, avaliadas nas horas 0, 72, 120 e 168 [6].

O teste de termoresistência (TTR), foi avaliado na hora 120 a partir de alíquotas de 10 mL de amostra incubadas em banho-maria a 37°C por 120 min e, após, avaliadas quanto a MT no min 120 de acondicionamento, no sistema automatizado de análise seminal. O TTR pode prever a competência funcional dos espermatozoides quando submetidos a condições similares de temperatura no trato reprodutivo da fêmea suína [6]. A morfologia espermática foi avaliada nas horas 72, 120 e 168, onde a lâmina produzida foi analisada sob imersão, a um aumento de 1000 vezes em microscópio óptico, onde foram contadas 200 células, estas classificadas morfológicamente em defeitos primários (PR), secundários (SC), terciários (TR) e células íntegras (IN) [6].

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS Studio<sup>2</sup>, onde submeteu-se as variáveis ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A partir disso aplicou-se a análise de variância onde as diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

## RESULTADOS

Os dados analisados diferiram quanto a concentração espermática (Tabela 1), onde o T3 apresentou resultados superiores ( $P < 0,05$ ) em 27,04% e 29,65% se comparado aos grupos T2 e T1, respectivamente. A motilidade total (MT) do T4 foi superior ( $P < 0,05$ ) em 0,56%; 1,98% e 3,28% se comparada ao T3, T2 e T1, respectivamente, demonstrando que o intervalo de 7 dias obteve o melhor resultado.

Os resultados obtidos pelo teste de termoresistência (TTR) demonstram que o T4 apresentou maior ( $P < 0,05$ ) MT em 4,96% e 7,71% em relação ao T3 e T1, respectivamente. Quanto aos dados referentes a integridade de membrana plasmática (IM) (Tabela 02), foi observado que as células com membrana íntegra foram superiores ( $P < 0,05$ ) no T4 em 6,45%; 8,09% e 12,72% se comparado ao T3, T2 e T1, respectivamente.

Quanto as substâncias reativas ao TBARS, os resultados demonstram que o grupo T1 foi superior ( $P < 0,05$ ) a T2 (6,18%), T3 (11,13%) e T4 (9,12%), ou seja, houve a ocorrência de maiores alterações às células espermáticas nestes animais. Em relação a morfologia espermática, quanto as células íntegras (IN) o grupo T4 foi superior ( $P < 0,05$ ) em 6,08%,

7,53% e 12,44% se comparada aos grupos T3, T2 e T1, respectivamente. Nas alterações primárias (PR), secundárias (SC) e terciárias (TR) o grupo T1 diferiu dos demais tratamentos, sendo superior ( $P < 0,05$ ) em 21,65%, 37,01%, 65,36% em PR; 25,42%, 32,16%, 62,63% em SC; 25,23%, 30,15% e 63,89% em TR, se comparadas aos grupos T2, T3 e T4, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Em relação a concentração espermática, os resultados deste estudo foram semelhantes aos apresentados na literatura, os quais demonstram uma redução no número de espermatozoides por ejaculados em animais com frequência de coletas de sete vezes na semana e, conseqüentemente com menor produção de doses inseminantes (DIs) [10]. Esta redução pode ser decorrente da alta exigência ao organismo, afetando a espermatogênese, não suprimindo a demanda necessária de células espermáticas em um curto período de tempo [11]. Outros autores comentam com base em trabalho semelhante executado, que essa redução pode ser fisiológica, ou seja, observada quando o manejo reprodutivo de coletas é realizado de forma consecutiva e visando a maximização da produção de DIs [12]. Relatam ainda sobre o uso de animais jovens e que, muitas vezes, se encontram em situações de falhas de manejo reprodutivo, nutricional e estresse, os quais poderiam influenciar na concentração de células espermáticas presentes nos ejaculados.

Quanto a MT, os resultados deste estudo foram semelhantes aos observados por outros autores, onde a MT se sobressaiu em coletas com intervalos de 7 dias, ocorrendo o oposto em frequências menores, ou seja, menor motilidade [10]. Isso também pode ser explicado através de relatos encontrados na literatura, onde em experimento envolvendo a frequência de coletas foram observados resultados semelhantes em intervalos de 2 dias, com motilidade menor nas avaliações de DIs produzidas neste período [18]. Os autores explicam como possível causa dos resultados a exaustão dos reservatórios de espermatozoides no epidídimo e, conseqüentemente, o menor tempo de maturação dos gametas. No entanto, em nosso estudo, apesar das diferenças estatísticas encontradas entre os tratamentos, foi possível observar que todos os resultados da MT são semelhantes aos recomendados pela literatura para utilização na elaboração de DIs. Assim, pode-se sugerir que todos os intervalos entre coletas

**Table 1.** Efeito do intervalo entre coletas de sêmen em relação aos parâmetros espermáticos (média do período ± erro padrão da média) de machos suínos no início da vida reprodutiva.

Parâmetro	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Volume (mL)	157,53±5,69	165,23±9,98	142,74±6,10	141,32±7,67
C (spztz/mL)	210,67±9,86 <sup>b</sup>	218,52±16,96 <sup>b</sup>	299,47±19,94 <sup>a</sup>	283,58±14,24 <sup>a</sup>
MT (%)	80,57±1,13 <sup>b</sup>	81,65±1,31 <sup>a</sup>	82,84±1,46 <sup>a</sup>	83,30±1,73 <sup>a</sup>
MT - TTR (%)	60,06±0,45 <sup>c</sup>	63,52±0,53 <sup>ab</sup>	61,85±0,56 <sup>bc</sup>	65,08±0,59 <sup>a</sup>

T1= intervalo entre coletas de 2 dias; T2= intervalo entre coletas de 3 dias; T3= intervalo entre coletas de 4 dias; T4= intervalo entre coletas de 7 dias; C= concentração espermática; MT= motilidade total; TTR= teste de termoresistência; <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente no teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

**Table 2.** Parâmetros de estresse oxidativo (TBARS) e morfologia espermática (média do período ± erro padrão da média) de machos suínos no início da vida reprodutiva.

Variável (%)	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
IM	80,70 <sup>c</sup>	84,98 <sup>b</sup>	86,50 <sup>b</sup>	92,46 <sup>a</sup>
TBARS	6,47e <sup>-09a</sup>	6,07e <sup>-09b</sup>	5,75e <sup>-09b</sup>	5,88e <sup>-09b</sup>
IN	81,76 <sup>d</sup>	86,35 <sup>c</sup>	87,70 <sup>b</sup>	93,38 <sup>a</sup>
PR	2,54 <sup>a</sup>	1,99 <sup>b</sup>	1,60 <sup>c</sup>	0,88 <sup>d</sup>
SC	5,94 <sup>a</sup>	4,43 <sup>b</sup>	4,03 <sup>b</sup>	2,22 <sup>c</sup>
TR	9,72 <sup>a</sup>	7,21 <sup>b</sup>	6,79 <sup>b</sup>	3,51 <sup>c</sup>

IM: integridade de membrana plasmática; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; IN: células espermáticas íntegras; PR: morfologia espermática - defeitos primários; SC: morfologia espermática - defeitos secundários; TR: morfologia espermática - defeitos terciários. <sup>a,b,c,d</sup>Letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ).

podem ser utilizados na rotina dos CPS pois, conforme a literatura, o requerimento mínimo para um ejaculado ser aceito em um programa de inseminação artificial (IA) é possuir MT mínima de 70% [5].

Pelos resultados do TTR, aborda-se novamente a situação da permanência dos gametas no epidídimo, em que esta região anatômica do trato reprodutor masculino tem grande importância na maturação espermática, interferindo diretamente em sua viabilidade [14]. É interessante salientar que a fertilidade do macho é de difícil predição e, portanto, sugere-se a análise combinada de diversos parâmetros seminais para possibilitar uma estimativa mais exata do potencial fecundante do sêmen [9]. No entanto, por ser a fertilidade comprometida com valores de motilidade

abaixo de 60% (em avaliações de TTR), este valor é usualmente utilizado como referência para a utilização das DIs [15]. Nesse contexto, pode-se observar em nosso estudo que a MT e a MT obtida a partir do TTR, de todos os tratamentos, apresentaram um perfil condizente com a possibilidade de utilização das DIs, independente dos diferentes intervalos entre as coletas e o período de conservação.

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para o metabolismo e função espermática [3]. Embora a integridade de membrana espermática seja frequentemente confundida com o termo “viabilidade”, essa nomenclatura não é cientificamente correta [4]. Mesmo que seja correto afirmar que a ruptura da membrana leva a morte da célula espermática, quase todas as colorações fornecem efetivamente informações sobre o “status” do espermatozoide [2]. No entanto, autores relatam que as deteriorações das membranas espermáticas podem estar intimamente ligadas com a subfertilidade ou até mesmo infertilidade dos reprodutores [19]. Todavia, é interessante salientar que conforme outros autores, na avaliação da integridade da membrana espermática, os ejaculados suínos devem apresentar 85% dos espermatozoides com membranas intactas para serem considerados de boa qualidade [4]. Nesse sentido, destacam-se os dados obtidos em nosso estudo, os quais apresentaram resultados confiáveis de integridade de membrana nos tratamentos com quatro e sete dias de intervalos entre coletas.

Deve-se entender ainda que os interferentes podem causar degradação da membrana, como é o caso das espécies reativas ao oxigênio (ROS), os quais, em concentrações fisiológicas atuam na capacitação espermática e hiperativação, na reação acrossomal e na interação espermo-oocitária, mas em valores superiores podem causar danos oxidativos [17]. Quanto aos resultados obtidos pelo TBARS, observa-se que

reprodutores submetidos a um ritmo intenso de coletas apresentaram maiores danos oxidativos em seus gametas, onde esse estresse é predisposto principalmente por desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes naturais do plasma seminal [1]. As ROS são formadas neste meio através de espermatozoides, principalmente imaturos, morfológica ou funcionalmente anormais e leucócitos que podem estar presentes [16]. Isso explica o resultado obtido neste trabalho, onde os animais com menor intervalo entre as coletas e conseqüente menor permanência dos gametas no epidídimo, apresentaram alta porcentagem de danos celulares no ejaculado.

Pela avaliação da morfologia espermática, as anormalidades podem ter origem em sua formação (testiculares) ou maturação (epididimárias) [14]. Esta última, por sua vez, está intimamente ligada com a frequência em que os ejaculados são coletados, interferindo em sua permanência nesta região, ocasionando maiores alterações morfológicas celulares. Isso explica os resultados obtidos no estudo, onde houve maior incidência de defeitos PR, SC e TR em T1, devido ao menor intervalo entre as coletas de sêmen. Resultados divergentes foram obtidos por outros autores, em que os defeitos nos gametas não apresentaram diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos executados [10]. Outros ainda citam que somente ejaculados que preencherem os requerimentos básicos na avaliação laboratorial devem ser utilizados para produção de DIs, ou seja, mínimo 80% de suas células espermáticas devem apresentar-se íntegras e sem defeitos morfológicos [5].

O estudo executado remete que a média dos ejaculados avaliados cumpre esse padrão de seleção, sugerindo sua utilização para IA, onde o melhor resultado observado foi em T4, com 7 dias de intervalo entre coletas, demonstrando maior número de células íntegras.

#### CONCLUSÃO

Machos suínos, no início da vida reprodutiva, podem ser submetidos a intervalos entre coletas de no mínimo 2 dias, sem comprometer a motilidade total das células espermáticas. Porém, os melhores resultados são obtidos a partir de uma frequência de coletas a cada 7 dias, ocasionando maiores valores de motilidade total, células morfológicamente saudáveis, com membrana íntegra e menores danos pelo efeito da peroxidação lipídica.

#### MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Magapor. Ejea de los Caballeros, Zaragoza, Spain.

<sup>2</sup>SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

**Acknowledgements.** Os autores agradecem a Central de Produção de Sêmen (CPS) de São Carlos - SC por conceder o espaço para a pesquisa, bem como o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

**Ethical approval.** O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (protocolado sob o CEUA nº 4076090318).

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the contents and writing of the paper.

#### REFERENCES

- 1 **Andrade E.R., Melo-Sterza F.A., Seneda M.M. & Alfieri A.A. 2010.** Conseqüências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 34(2): 79-86.
- 2 **Badell S.S. 2002.** Efectes del fotoperíode sobre la qualitat espermàtica de mascles porcins sus domesticus. Girona, Espanha. Tese (Doutorado em Biologia) - Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade de Girona.
- 3 **Bernardi M.L. 2008.** Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(Supl 1): 5-16.
- 4 **Bonet S., Casas I., Holt W.V. & Yeste M. 2013.** *Boar Reproduction, Fundamentals and New Biotechnological Trends*. New York: Springer, 634p.
- 5 **Bortolozzo F.P., Wentz I., Ferreira F.M., Bennermann P.E. & Bernardi M.L. 2005.** *Exame do ejaculado*. In.: Bortolozzo F.P., Wentz I., Bennermann P.E., Bernardi M.L., Wollmann E.B., Ferreira F.M. & Borchardt Neto G. (Eds). *Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada*. Porto Alegre: Pallotti, pp.69-90.
- 6 **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p.

- 7 Cruz D.F., Lume C., Silva J.V., Nunes A., Castro I., Silva R. & Silva V. 2015. Oxidative stress markers: can they be used to evaluate human sperm quality? *Turkish Journal of Urology*. 41(4): 198-207.
- 8 Ferreira F.M., Wentz I., Scheid I.R., Afonso S.B., Guidoni A.L. & Bortolozzo F.P. 2005. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. *Ciência Rural*. 35(1): 131-137.
- 9 Flowers W.L. 1997. Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility*. (Suppl 52): 67-78.
- 10 Frangez R., Gider T. & Kosec M. 2005. Frequency of boar ejaculate collection and its influence on semen quality, pregnancy rate and litter size. *Acta Veterinariae Brno*. 74: 265-273.
- 11 Knecht D., Jankowska-Mąkosza A. & Duziński K. 2017. The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boars productivity. *Livestock Science*. 201(9): 13-21.
- 12 Marques I.S., Paiva B.G., Durães M.J.O., Souza D.C., Barbosa G.F. & Marques Filho W.C. 2018. Efeito da frequência de coleta sobre a qualidade do sêmen suíno. In: *VII Seminário de Iniciação Científica do IFNMG* (Araçuaí, Brasil). pp.1-3.
- 13 Mellagi A.P.G., Quirino M., Oliveira G.S., Gaggini T.S., Paschoal A.F.L., Lucca M.S., Ulguim R.R. & Bortolozzo F.P. 2019. Atualizações na avaliação andrológica em suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 43(2): 47-53.
- 14 Pruneda A., Pinart E., Briz M.D., Sancho S., Garcia-Gil N., Badia E., Kádár E., Bassols J., Bussalleu E., Yeste M. & Bonet S. 2005. Effects of a high semen collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*. 63: 2219-2232.
- 15 Reis G.R., Bernardi M.L., Schwarz P., Bortolozzo F.P. & Wentz I. 2002. Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. *Acta Scientiae Veterinariae*. 30(3): 159-166.
- 16 Rigo V.H.B. 2016. Influência do Resveratrol na Qualidade e na Fertilidade do Espermatozoide Suíno Refrigerado entre 15-17 por 72 horas para Inseminação Artificial Intrauterina. 125f. Pirassununga, SP. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 17 Rigo V.H.B., Martin S.M.M.K., Nichi M., Freitas F.V. & Andrade A.F.C. 2017. O uso do Resveratrol na conservação do sêmen suíno sob refrigeração. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 40(2): 615-619.
- 18 Schlling E. & Vengust M. 1987. Frequency of semen collection in boars and quality of ejaculates as evaluated by the osmotic resistance of acrosomal membranes. *Animal Reproduction Science*. 12: 283-290.
- 19 Tanno P.H. 2009. Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo. 100f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo.