UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Julianni Dornelles

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE COLETAS DE SÊMEN EM MACHOS REPRODUTORES SUÍNOS NO INÍCIO DA VIDA REPRODUTIVA

Santa Maria, RS, Brasil.
2019

Julianni Dornelles

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE COLETAS DE SÊMEN EM MACHOS REPRODUTORES SUÍNOS NO INÍCIO DA VIDA REPRODUTIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi

Santa Maria, RS, Brasil.
2019

Dornelles, Julianni
AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE COLETAS DE SÊMEN EM MACHOS REPRODUTORES SUÍNOS NO INÍCIO DA VIDA REPRODUTIVA / Julianni Dornelles.- 2019.
62 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Rigon Rossi
Coorientadora: Marta Lizandra Do Rego Leal
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. Frequência de coletas 2. Ejaculado 3. Espermatozoide 4. Gônadas I. Rigon Rossi, Carlos Augusto II. Do Rego Leal, Marta Lizandra III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Julianni Dornelles

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE COLETAS DE SÊMEN EM MACHOS REPRODUTORES SUÍNOS NO INÍCIO DA VIDA REPRODUTIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi (UFSM)

(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Soares (UFSM)

Prof. Dr. Walter Lucca (IFRS - Campus Sertão)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Angela e Mauro, e meu irmão Lucas, por todo amor e apoio dado para alcançar meus objetivos e realizar meus sonhos.

A todos meus amigos pelo incentivo e companheirismo.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de cursar o curso de pós-graduação, e pelo apoio estudantil, fundamental para que eu pudesse ter uma boa formação.

A empresa Bretanha, pelo apoio e disponibilização de uma parte dos recursos necessários para a realização da pesquisa.

Ao Professor orientador Carlos Rossi, pela oportunidade e auxílio na execução do trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Andrologia Veterinária pela ajuda e colaboração durante todo o curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pelo apoio.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE COLETAS DE SÊMEN EM MACHOS REPRODUTORES SUÍNOS NO INÍCIO DA VIDA REPRODUTIVA

AUTORA: Julianni Dornelles
ORIENTADOR: Carlos Augusto Rigon Rossi

Na reprodução de suínos, com os avanços específicos em genética e demanda do mercado suinícola, há a necessidade de se avaliar a possibilidade do maior aproveitamento dos animais jovens, e com isso aumentar a produção de doses inseminantes, bem como maximizar sua vida útil nos centros de difusão genética. O objetivo deste estudo foi avaliar quais os melhores intervalos entre coletas de sêmen de suínos reprodutores no início da vida reprodutiva, com 9 meses de idade. Para isso, 20 suínos foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos (T): T1- intervalo entre coletas de dois dias; T2- intervalo entre coletas de três dias; T3- intervalo entre coletas de quatro dias e T4- intervalo entre coletas de sete dias. Os ejaculados foram diluídos em Vitassem® (diluente de longa duração), e produzidas doses inseminantes, as quais, foram avaliadas quanto ao volume, motilidade total, motilidade massal, concentração total, número total de células, morfologia, integridade de membrana e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As doses de sêmen produzidas foram avaliadas nas horas 0, 24, 72, 120 e 168. Foram realizadas medidas testiculares (comprimento, largura e volume). O T3 apresentou concentração espermática 5,6% ($p>0,05$), 37,04% ($p<0,05$) e 42,15% ($p<0,05$) superior se comparado ao T4, T2 e T1. A motilidade total do T4 foi superior em 0,79% ($p>0,05$), 2,02% ($p>0,05$) e 3,38% ($p<0,05$) se comparada ao T3, T2 e T1, respectivamente. O volume do testículo direito do T4 foi 18,48% ($p<0,05$), 23,14% ($p<0,05$) e 34,46% ($p<0,05$) em comparação a T3, T2 e T1, respectivamente. Na avaliação da morfologia espermática para células normais, o T4 foi superior em 6,47% ($p<0,05$), 8,14% ($p<0,05$) e 14,21% ($p<0,05$) se comparada aos grupos T3, T2 e T1. O grupo T4 apresentou integridade de membrana plasmática normais ($p<0,05$) de 6,89%, 8,8% e 14,57 quando comparado com T3, T2 e T1, respectivamente. Já o TBARS do grupo T1 foi 6,58%, 12,52% e 10,03% superior ($p<0,05$) aos grupos T2, T3 e T4, respectivamente. Esses resultados indicam que menores intervalos entre coletas de sêmen, influenciam negativamente as características quantitativas e qualitativas das células espermáticas. O intervalo entre coletas de 3 e 4 dias proporcionou os melhores resultados sobre a viabilidade espermática.

Palavras-chave: Células espermáticas. Doses inseminantes. Intervalos entre coletas. Parâmetros espermáticos.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE FREQUENCY OF SEMEN COLLECTIONS IN BREED REPRODUCTIVE MALES IN THE BEGINNING OF REPRODUCTIVE LIFE

AUTHOR: Julianni Dornelles

ADVISOR: Carlos Augusto Rigon Rossi

In breeding pigs, with the specific advances in genetics and demand of the swine market, it is necessary to evaluate if it is possible the greater use of the young animals and with that increase the production of inseminating doses and to maximize their useful life in the centers of artificial insemination .Therefore, the objective of this study was to evaluate the best intervals for the collection of semen from boars at the beginning of their reproductive life, at nine months of age. For this, twenty boars were randomly distributed in four treatments (T), being T1 - interval between collections of two days; T2- interval between collections of three days; T3- interval between collections of four days and T4- interval between collections of seven days (control). The ejaculates were diluted in Vitassem® (long acting diluent), and inseminating doses were produced, which were evaluated for the volume, total motility, mass motility, total concentration, , total number of cells, morphology, membrane integrity and reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) The inseminated doses were evaluated at hours 0, 24, 72, 120 and 168) and testicular measurements (length, width and volume). The T3 group presented a spermatic concentration of 5.6% ($p > 0.05$), 37.04% ($p < 0.05$) and 42.15% ($p < 0.05$) higher than T4, T2 and T1. The total motility of T4 was higher in 0.79% ($p > 0.05$), 2.02% ($p > 0.05$) and 3.38% ($p < 0.05$) than in T3, T2 and T1, respectively. The right testicle volume in the T4 was 18.48% ($p < 0.05$), 23.14% ($p < 0.05$) and 34.46% ($p < 0.05$) compared to T3, T2 and T1, respectively. In the evaluation of sperm morphology for normal cells, T4 was higher in 6.47% ($p < 0.05$), 8.14% ($p < 0.05$) and 14.21% ($p < 0.05$) when compared to the groups T3, T2 and T1. The T4 group had normal plasma membrane integrity ($p < 0.05$), 8.8% ($p < 0.05$) and 14.57 ($p < 0.05$) plasma membrane integrity when compared to T3, T2 and T1. And for the Tbars parameters, the T1 group was 6.58% ($p < 0.05$), 12.52% ($p < 0.05$) and 10.03% ($p < 0.05$) higher than the groups T2, T3 and T4, respectively. These results indicate that short intervals between semen collections negatively influence the quantitative and qualitative characteristics of sperm cells. The four day interval between collections provides the best results on sperm viability.

Key words: Sperm cells. Inseminating doses. Intervals between collections. Sperm parameters.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Características do ejaculado suíno.....23

MANUSCRITO

Tabela 1. Efeito de diferentes frequências em relação aos parâmetros espermáticos e tamanho testicular (média ± erro padrão da média) de machos suínos no início da vida reprodutiva.....52

Tabela 2. Parâmetros de viabilidade espermática e estresse oxidativo (TBARS) entre diferentes intervalos de coleta.....53

Tabela 3. Parâmetros de viabilidade espermática e estresse oxidativo (TBARS) entre diferentes intervalos de análise.....54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Relação da Liberação Hormonal na Corrente Sanguínea. 16
Figura 2 - Sistema reprodutor do macho suíno..... 17
Figura 3- Maturação Espermática..... 20

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 13

2 INTRODUÇÃO 13

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15

3.1 PUBERDADE DO REPRODUTOR SUÍNO 15

3.2 ANATOMOFISIOLOGIA DO REPRODUTOR SUÍNO 16

3.2.1 Testículos 17

3.2.1.1 Células de Leydig 18

3.2.1.2 Células de Sertoli. 18

3.2.1.3 Espermatogênese 19

3.2.1.4 Espermatozoides. 20

3.2.2 Epidídimo 20

3.2.3 Ductos deferentes 21

3.2.4 Glândulas sexuais anexas 21

3.2.4.1 Glândulas vesiculares 21

3.2.4.2 Glândula prostática 22

3.2.4.3 Glândulas bulbouretrais. 22

3.2.5 Pênis e prepúcio 22

3.2.6 Ejaculado suíno 22

3.3 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS 23

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA CÉLULA ESPERMÁTICA 25

3.5 FREQUÊNCIA DE COLETAS NA ESPÉCIE SUÍNA 27

3.6 IMPORTÂNCIA DO MACHO REPRODUTOR. 29

3.7 SELEÇÃO E DESCARTE DE MACHOS REPRODUTORES 30

3.8 TREINAMENTO PARA COLETA DE SÊMEN. 32

4 CAPÍTULO 2 - FREQUÊNCIA DE COLETAS DE SÊMEN EM MACHOS REPRODUTORES SUÍNOS NO INÍCIO DA VIDA REPRODUTIVA: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS 35

RESUMO 35

ABSTRACT 36

INTRODUÇÃO.....38

MATERIAL E MÉTODOS 39

RESULTADOS E DISCUSSÃO. 40

CONCLUSÃO 46

AGRADECIMENTOS.....47

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA.....47

REFERÊNCIAS 47

CONCLUSÃO.....55

REFERÊNCIAS 56

APRESENTAÇÃO

As metodologias, resultados e discussões, que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de artigo científico (disponível no capítulo 2) a serem enviados para publicação na revista científica: **Ciência Rural**.

As **REFERÊNCIAS APRESENTADAS do capítulo 1** são as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira é representada por um rebanho de aproximadamente 41,1 milhões de cabeças (SEAB, 2017). Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor de suínos e quarto maior exportador de carne suína do mundo. A produção de carne suína é de aproxidamente 3,75 milhões de toneladas/ano, das quais 19,53% são produzidas no Rio Grande do Sul. Mesmo com esses índices produtivos, o consumo per capita ainda permanece em torno 14,7 quilogramas, onde a maior parte está concentrada no consumo de embutidos (ABIPECS, 2018).

O aumento da produtividade e a busca constante por qualidade, agregação de valor ao produto e bem-estar dos animais de produção, é resultado do desenvolvimento tecnológico e científico inserido na suinocultura atual. Sabe-se que não bastam apenas bons padrões nutricionais e boas práticas de manejo no plantel como um todo. São necessários que os índices reprodutivos sejam excelentes, o que faz com que uma atenção especial seja dada ao plantel de reprodutores, já que estes estão diretamente relacionados à produtividade dessa atividade (CASTRO et al., 2016).

Ao mesmo tempo, intensificaram-se os investimentos no melhoramento genético e o interesse de técnicos e empresas em desenvolver manejos específicos para cada fase de produção, incluindo a criação e seleção de machos reprodutores. A seleção dos machos para reprodução é realizada principalmente com base em características de crescimento e rendimento de carcaça, bem como pelas características genéticas desejáveis nos plantéis (CASTRO et al., 2016). Para a eficácia desse processo, bem como para a rápida distribuição do material genético entre os elos da cadeia, destaca-se a inseminação artificial (IA), que é utilizada mundialmente na suinocultura (AREND et al., 2014). Com as mudanças ocorridas na indústria brasileira, atualmente se estima o uso da IA em mais de 90% do plantel brasileiro tecnificado (RIENSENBECK, 2011).

Dessa forma busca-se a produção de grandes quantidades de doses inseminantes de qualidade em um período de tempo adequado. Quanto maior o número de doses inseminantes obtidas de um ejaculado e a qualidade desse ejaculado, mais rentável será

para a central. Alguns aspectos desde a coleta e análise do ejaculado, da preparação, do armazenamento e do transporte da dose inseminante (DI) podem comprometer a viabilidade e eficiência da técnica. O diluente utilizado deve ser de boa qualidade e adequado ao período de conservação (curta, média ou longa ação) que se deseja, visando garantir a viabilidade máxima dos espermatozoides até o momento da utilização da dose (BORTOLOZZO et al., 2005).

Outro aspecto relevante é a taxa de reposição de machos doadores de sêmen nas centrais de difusão genética, a qual varia entre 40% e 60% ao ano e com os avanços específicos em genética e demanda do mercado suinícola, essa taxa de reposição pode aumentar para 100% ou até mesmo 150 porcento. Isto pode estar relacionado aos ganhos genéticos contínuos obtidos por granjas de melhoramento genético de suínos, que testam grande número de animais, realizam avaliações genéticas frequentes, e dispõem de grande número de reprodutores de raças diferentes. Esses ganhos, tanto em características reprodutivas, como de desempenho e de carcaça, devem ser explorados pelos produtores de leitões e de suínos para o abate, através da introdução de reprodutores de reposição de alto valor genético em seus planteis. Este fator é relevante e permite aos criadores comerciais explorarem as vantagens dos ganhos genéticos obtidos em cada uma das raças utilizadas. Ainda devemos salientar sobre as vantagens da heterose presente nos machos híbridos e nos leitões e suínos produzidos para o abate. Neste contexto, há a necessidade de avaliar a possibilidade do maior aproveitamento dos animais e com isso aumentar a produção de doses inseminantes e maximizar sua vida útil nas centrais de inseminação artificial. No entanto, com o aumento na frequência de coletas de ejaculados dos machos reprodutores, pode aumentar os índices de anormalidades nas células espermáticas e influenciar a qualidade das doses inseminantes produzidas. Por isso, torna-se importante avaliar se o maior aproveitamento dos animais irá influenciar na qualidade das características espermáticas dos mesmos (PRUNEDA et al., 2005).

Este estudo objetivou avaliar quais são os melhores intervalos entre coletas de sêmen de suínos reprodutores com 9 meses de idade em relação as características quantitativas e qualitativas das células espermáticas no sêmen diluído em Vitassem®.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PUBERDADE DO REPRODUTOR SUÍNO

A puberdade no macho reprodutor suíno é definida como o período a partir do qual ele atinge a capacidade de fertilização. Significa que o suíno deve possuir número de espermatozoides fecundantes, bem como um comportamento sexual que permita a cópula (GONZÁLEZ, 2002).

O sistema reprodutor masculino é regulado por mecanismos de retroalimentação que envolvem o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo secreta GnRH de maneira pulsátil, que estimula a secreção do LH e do FSH pela hipófise anterior. Irregularmente, a baixa frequência de GnRH induz a hipófise anterior a liberar FSH, enquanto que uma alta frequência de GnRH leva a liberação de LH (BRACKETT, 2014; BRINSKO, 2007; GARNER e HAFEZ, 1996).

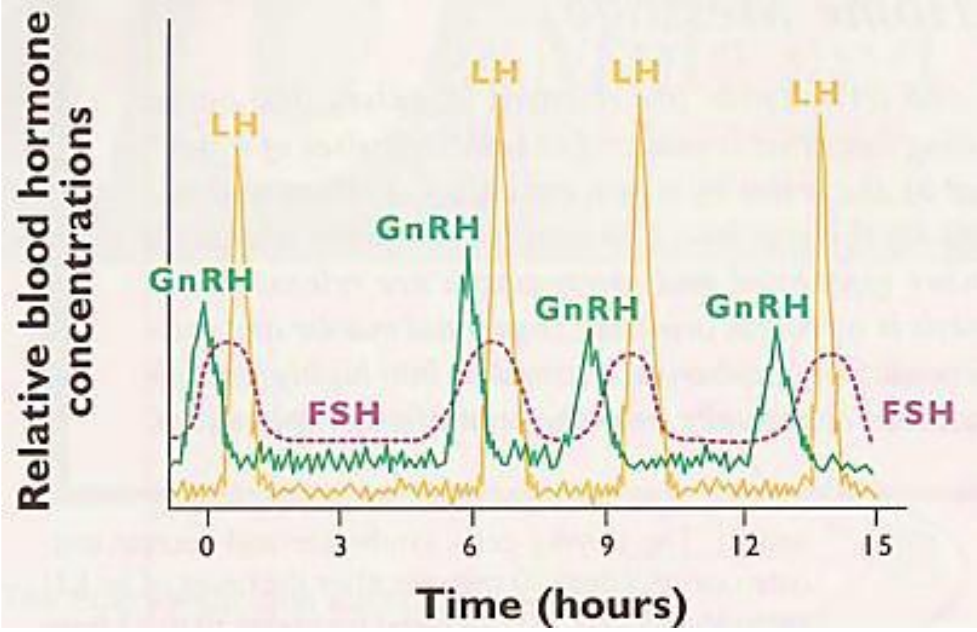
No reprodutor suíno, a puberdade, se inicia quando as primeiras células espermáticas maduras são encontradas na cauda do epidídimo, em torno de 120 dias de idade. Alguns eventos simultâneos à puberdade ocorrem nos testículos, como por exemplo o aumento do diâmetro e da longitude dos túbulos seminíferos e a formação da luz tubular, sendo precedidos do aumento das concentrações de FSH (hormônio folículo estimulante) circulante que provoca, entre outras alterações, o desenvolvimento de receptores de LH (hormônio luteinizante) nos testículos e em seguida o aumento da secreção de testosterona (ABRAHÃO, 2006).

A testosterona (C19H28O2) apresenta um papel fundamental na puberdade do reprodutor suíno, prolongando a vida útil dos espermatozoides no epidídimo e estimulando o crescimento, desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, como a próstata, as glândulas vesiculares e bulbouretrais, os vasos deferentes e, atribuindo as características corporais dos machos (OBERLENDER, 2010). A passagem da testosterona para os túbulos seminíferos ocorre por difusão simples ou facilitada, deslocando-se para a corrente sanguínea, onde também desempenha importante papel na manutenção da libido (MARTINS, 2004).

O LH estimula as células de Leydig a produzir andrógenos, convertendo o colesterol em testosterona. Os andrógenos são secretados para as células de Sertoli e para a corrente sanguínea (GARNER e HAFEZ, 1996).

O FSH age nas células germinativas dos túbulos seminíferos do testículos sendo responsável pelo estímulo à espermatogênese, controlando a atividade secretória das células de Sertoli e potencializando, de forma indireta, o efeito do LH. Também está envolvido na síntese de estradiol a partir da testosterona pelas células de Sertoli (HAFEZ, 1995).

Figura 1- Relação da Liberação Hormonal na Corrente Sanguínea.

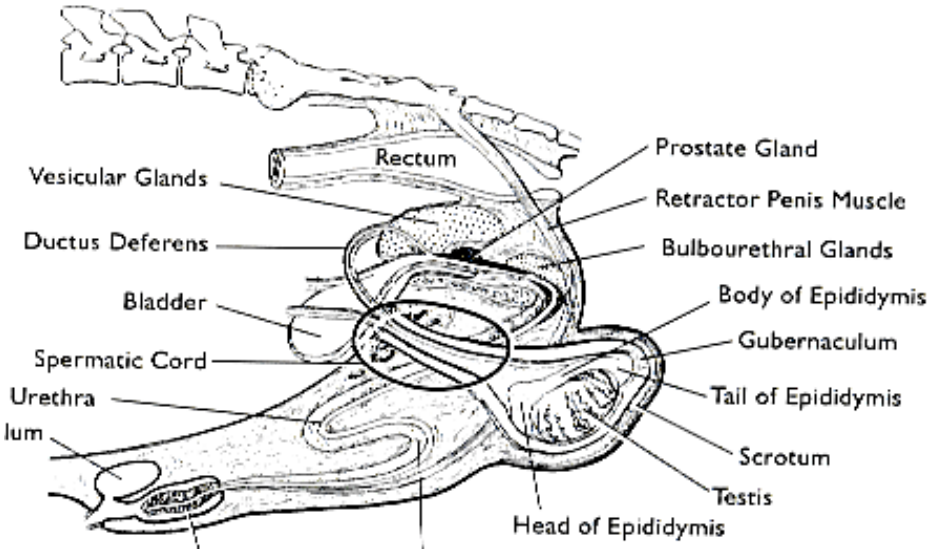


Fonte: (SENGER, 2003)

1.2 ANATOMOFISIOLOGIA DO REPRODUTOR SUÍNO

O sistema reprodutivo do macho suíno está localizado internamente no abdômen e fora da cavidade abdominal, na região da virilha, sendo apoiado pela pélvis (KNOX, 2003). É formado por diferentes estruturas, como os testículos, os epidídimos, o sistema dos ductos urogenitais e as glândulas sexuais secundárias (ABRAHÃO, 2006).

Figura 2 - Sistema reprodutor do macho suíno.



Fonte: (FRANDSON, 2009)

1.2.1 Testículos

As gônadas do macho têm como função primária a produção de células espermáticas, denominadas espermatozoides e, a produção de andrógenos (ABRAHÃO, 2006). Os testículos, na espécie suína, estão localizados fora do abdômen, na região perineal em um plano inclinado, permanecendo próximo da parede do corpo. Estando contidos dentro de uma bolsa chamada escroto, que possui importantes funções de proteção e regulação da temperatura (KNOX, 2003). São constituídos pelos túbulos seminíferos, células de Leydig, capilares, vasos linfáticos, células de Sertoli, entre outras estruturas de preenchimento (GARTNER e HIATT, 2003).

Os espermatozoides são produzidos ao longo de todo comprimento dos túbulos seminíferos. Após serem produzidos, deixam a parte inferior dos testículos, e ficam armazenados na região superior (KNOX, 2003). Os túbulos seminíferos são compostos internamente por dois tipos de células somáticas (as células mióides e as células de Sertoli) e de células germinativas e, externamente aos túbulos situam-se as células de Leydig (GARTNER e HIATT, 2003).

Quando ocorre a espermatogênese, os espermatozoides saem dos túbulos seminíferos e se deslocam para dentro do epidídimo (SENGER, 2003). Onde permanecem durante o seu processo de maturação (CORRÊA, 2001).

1.2.1.1 Células de Leydig

As células intersticiais de Leydig estão localizadas externamente aos túbulos seminíferos, sendo responsáveis pela produção de testosterona essencial para o desenvolvimento e a manutenção da espermatogênese e outras características masculinas (GARNER e HAFEZ, 1996). As células de Leydig também produzem 5α-androstenona, que é um andrógeno secretado pela saliva, atuando como um feromônio e contribuindo para o odor de urina característico na carne do reprodutor, sendo encontrada em níveis mais elevados que a testosterona (BRACKETT, 2014).

As células de Leydig são dependentes do efeito trópico de LH para seu crescimento e função. O LH estimula as células regulando assim a produção de testosterona (BRACKETT, 2014).

1.2.1.2 Células de Sertoli

As células de Sertoli são encontradas revestindo a luz dos túbulos seminíferos e são dependentes de FSH sendo responsáveis pela produção de:

- Estrogênio: encontrado em grandes quantidades no sêmen, produzido a partir da conversão, pelas células de Sertoli, da testosterona para estrogênio, via enzima aromatase.
- Inibina: é difundida para o cérebro, sendo um importante componente da regulação das gonadotrofinas do macho.
- ABP (Proteína ligante de andrógenos): influenciada pelo FSH, facilita a entrada de testosterona do tecido intersticial para dentro dos túbulos. Estando envolvida na maturação de espermatozoides e produção de hormônios (ABRAHÃO, 2006; CUPPS, 1991).

1.2.1.3 Espermatogênese

A espermatogênese consiste na transformação de espermatogônias em espermatozoides (BRACKETT, 2014). Esse processo ocorre em um ciclo aproximado de 35 dias no reprodutor suíno (CORRÊA, 2001). A espermatogênese tem início nas espermatogônias que encontram-se revestindo a parede tubular e seu término ocorre no momento em que os espermatozoides são liberados no lúmen do túbulo seminífero (BRACKETT, 2014). Este processo é divido em três grandes fases: espermatocitogênese, meiótica e espermiogênese.

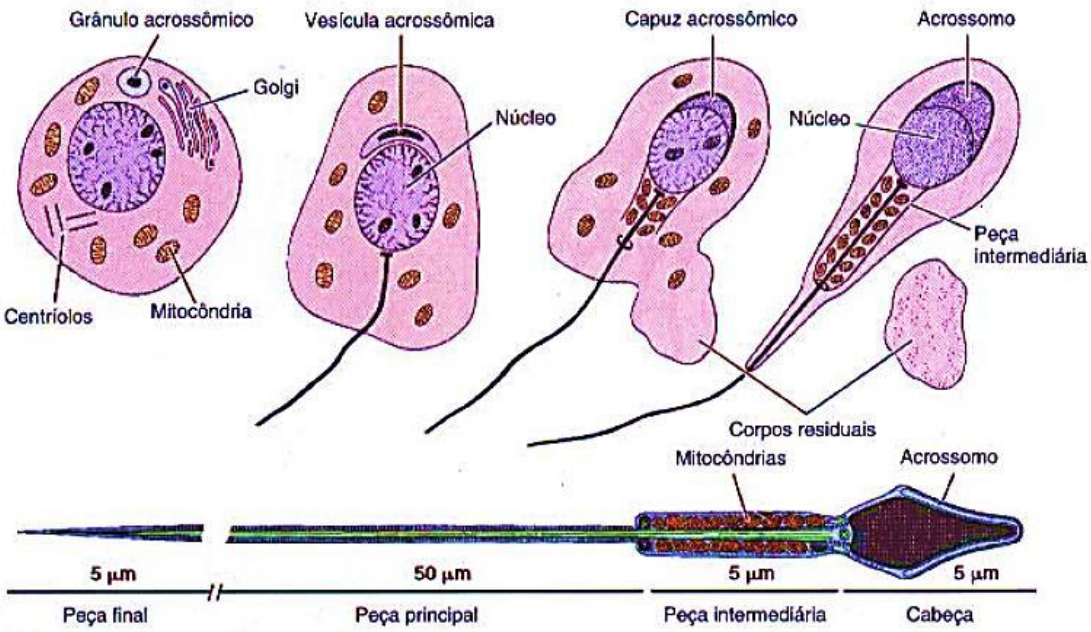
Na fase da espermatocitogênese ocorre duas importantes funções:

- Divisão mitótica de espermatogônias tipo A, que permanecerão inativas e não serão usadas imediatamente para a produção de espermatozoides.
- Transformação das espermatogônias tipo A em espermatogônias tipo B que se diferenciarão em espermatócitos primários (BRINSKO, 2007).

Na fase meiótica, os espermatócitos primários duplicam seu DNA e sofrem modificações progressivas de prófase meiótica antes de se dividirem em espermatócitos secundários. Sem outra síntese de DNA os espermatócitos secundários dividem-se novamente para formar as células haplóides, chamadas de espermátides (GARNER e HAFEZ, 1996). A terceira e última parte do processo de produção dos espermatozoides é a espermiogênese. É nesta fase em que as espermátides são transformadas em espermatozoides através de uma série de modificações morfológicas progressivas (BRACKETT, 2014). São notadas quatro fases neste processo de desenvolvimento. Na fase de Golgi (Figura 3), as vesículas fundem-se de maneira progressiva para a formação do acrossoma (BRACKETT, 2014). Já na fase do capuz, a vesícula acrossômica aumenta de tamanho e sua membrana envolve parcialmente o núcleo. A fase do acrossomo caracteriza-se por várias modificações da morfologia da espermátide. O núcleo torna-se condensado, a célula se alonga e as mitocôndrias mudam de localização (GARTNER e HIATT, 2003).

A fase de maturação da espermiogênese envolve a transformação final das espermátides alongadas em células que são liberadas para dentro dos túbulos seminíferos. Esse processo de liberação é chamado de espermiação (GARNER e HAFEZ, 1996).

Figura 3- Maturação Espermática.



Fonte: (GARTNER; HIATT, 2003)

1.2.1.4 Espermatozoides

Os espermatozoides, resultantes da espermatogênese e completamente desenvolvidos, são células alongadas, formados por uma cabeça, que contém uma cromatina condensada com DNA e o acrossoma (contendo substâncias hidrolíticas); e uma cauda, onde na peça intermediária estão localizadas as mitocôndrias que fornecem a energia necessária para as células espermáticas. Já a cauda é composta por axonemas, responsáveis pela motilidade espermática (GARNER e HAFEZ, 1996).

1.2.2 Epidídimo

O epidídimo é constituído por um revestimento muscular liso, que tem a função de auxiliar na movimentação do esperma através de ondas peristálticas na direção dos canais deferentes. O epidídimo é composto de um túbulo, único, tortuoso e que é essencial para o armazenamento, maturação e transporte de espermatozoides (CORRÊA, 2001).

O epidídimo é formado por três partes anatômicas: cabeça, corpo e cauda (SETCHELL, 1993). O epidídimo, no macho suíno, é grande sendo que a cauda é dorsal e a cabeça ventral (ASHDOWN e HAFEZ, 1996). Os espermatozoides chegam na cabeça do epidídimo sem serem férteis e sem mobilidade, e levam de 9 a 14 dias para migrar até

a cauda do epidídimo, principal local de armazenamento (KNOX, 2003). As secreções epididimárias possuem fatores de maturação que promovem alterações no potencial para motilidade progressiva, alterações em mecanismos metabólicos, perda da gota citoplasmática e alterações de membrana plasmática, acrossoma e conteúdo nuclear (CORRÊA, 2001).

A cauda do epidídimo segue com o ducto deferente das vias espermáticas e funciona como o principal local de armazenamento pré-ejaculatório para o esperma, estima-se que cerca de 75% dos espermatozoides totais estejam contidos neste local. Os espermatozoides se tornam móveis e adquirem competência para fertilizar no corpo dos epidídimos devido a secreção de fatores pelas células localizadas nesta região (KNOX, 2003). Os espermatozoides armazenados no epidídimo retêm a capacidade fertilizante por várias semanas (ASHDOWN e HAFEZ, 1996).

1.2.3 Ductos deferentes

O ducto deferente segue como uma continuação do epidídimo, seguindo a partir da cauda do epidídimo para a uretra pélvica. Têm como principal função transportar os espermatozoides do epidídimo para a uretra (KNOX, 2003).

1.2.4 Glândulas sexuais anexas

O suíno apresenta as glândulas prostática, vesiculares e bulbouretrais, estando ausentes as ampolas do ducto deferente. A função das glândulas sexuais anexas é adicionar substâncias no ejaculado para aumentar o volume, proteger as células espermáticas e fornecer os nutrientes necessários para garantir a fertilidade dos espermatozoides (KNOX, 2003). Estão localizadas ao lado da uretra pélvica, secretando fluído e gel, responsáveis por 90% do volume ejaculado suíno (CORRÊA, 2001).

1.2.4.1 Glândulas vesiculares

Estão situadas na região lateral da porção final de cada ducto deferente. São pares, grandes e menos compactas (ASHDOWN e HAFEZ, 1996). São responsáveis pela maioria dos fluídos do sêmen usados como substratos energéticos pelos espermatozoides (CORRÊA, 2001).

1.2.4.2 Glândula prostática

Localizada acima da glândula vesicular. Sua secreção possui a função de neutralizar a acidez das secreções vaginais e dar odor ao sêmen (CORRÊA, 2001).

1.2.4.3 Glândulas bulbouretrais

As glândulas bulbouretrais apresentam-se em pares, são grandes, dorsais a uretra, próximas a extremidade de sua porção pélvica e recobertas por uma espessa camada de músculo estriado bulboglandular. São importantes para a formação da substância gelatinosa do sêmen (ASHDOWN e HAFEZ, 1996). Esta é uma característica única do ejaculado suíno, apresentando função *in vivo* de reter o ejaculado na cérvix e, assim minimizar o refluxo (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

1.2.5 Pênis e prepúcio

O pênis do suíno é fibroelástico e possui a sua glande espiralada em formato de "saca-rolhas". Em suínos, a ereção peniana ocorre devido a estímulos olfatórios, auditivos e visuais, que estimulam o músculo retrator do pênis que controla o efetivo comprimento do pênis por sua ação na flexura sigmóide e o preenchimento dos espaços cavernosos (CORRÊA, 2001).

O prepúcio tem como função proteger o pênis, é formado por uma dupla invaginação da pele que cobre a porção livre do pênis (KNOX, 2003). O prepúcio contém um divertículo acessível à palpação, podendo ocorrer o acúmulo de urina, sêmen e outras secreções o que possibilita o desenvolvimento de bactérias (CORRÊA, 2001).

1.2.6 Ejaculado suíno

O ejaculado é uma suspensão de espermatozoides em um plasma seminal composto de uma mistura de fluídos, provenientes dos testículos, epidídimos e das glândulas sexuais anexas (BRACKETT, 2014). O ejaculado do suíno difere em vários aspectos dos outros animais domésticos. Suas principais características estão descritas na tabela 1.

O ejaculado suíno possui três frações: a pré-espermática (composta pela secreção uretral das glândulas bulbouretrais bem como da próstata), a fração rica ou espermática (contém grande quantidade de espermatozoides) e a fração pós-espermática (que contém menos espermatozoides) (CORRÊA, 2001).

O plasma seminal é a porção fluída do sêmen, incorporada durante a ejaculação. Os seus componentes são: eletrólitos, frutose, ácido ascórbico, diversas enzimas, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento (BRACKETT, 2014). A presença ou ausência de muitos desses componentes podem estar envolvidas com a fertilidade (MATOS, 2008).

Tabela 1 - Características físicas do ejaculado suíno

Características	Amplitude
Volume Filtrado (mL)	50 - 600
Cor	Branco acinzentado
Odor	*Sui generis*
Movimento de massa	Ausente
Concentração ($x10^6$ sptz mL^{-1})	180 - 400
Total de sptz ($x10^9$ sptz mL^{-1})	20 - 80
Motilidade (%)	≥ 50
Vigor	≥ 3
Sptz normais (%)	≥ 70

Fonte: (CORRÊA, 2001; CBRA, 2013).

1.3 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

A avaliação dos espermatozoides deve ser realizada com o objetivo uso de animais com boa fertilidade, o que resulta em excelentes índices reprodutivos. As avaliações de motilidade, concentração, morfologia e outras características que influenciam a funcionalidade do esperma (integridade de membrana, acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e fragmentação de DNA); devem ser realizadas a cada ejaculado para que tenhamos a certeza da qualidade do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial.

A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas na literatura como importantes ferramentas na seleção de um ejaculado. Para tanto, o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal nas centrais de inseminação artificial é a

determinação da percentagem de espermatozoides móveis (VERSTEGEN, 2002). No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esse conceito é falho e, na realidade, não é o número de espermatozoides móveis ou morfologicamente normais que determina a fertilidade e sim, sua competência funcional de fertilizar o óvulo (MAIA, 2006).

A quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva. Entretanto, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desse parâmetro devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (MATOS, 2008). O sistema CASA (Sistema de Análise Computadorizada de sêmen - Magavision®, Magapor) utiliza câmaras de contagem específicas (câmara de contagem celular 125- mobilidade individual e masal: 5 análises por unidade) do equipamento. A avaliação transcorre em 2 etapas: primeira etapa em lâmina de vidro 15 x 40 mm, previamente aquecida a 37 graus Celsius. A fração de 50µL (microlitros) de cada ejaculado é submetida a um aumento de 40x em plano microscópico de fundo branco. Nesta etapa são avaliadas a intensidade das ondas formadas pelo movimento dos espermatozoides através da formação de uma grade fictícia sobre a amostra. A partir desta, são calculados o vigor e o movimento das células. O movimento espermático é avaliado em escala (0 a 5,5), sendo considerado aprovado acima de 2,7 (equivalente a 70% de motilidade), onde segue a próxima etapa. O módulo de motilidade opera sobre a atribuição de um valor numérico calculado a partir de algorítmos matemáticos que calculam a velocidade e a quantidade de células que cruzam as linhas traçadas pelo programa. A segunda etapa se dá com o módulo de concentração e morfologia espermática que se baseia no conhecimento da superfície do campo observado, assim como da profundidade do mesmo. A partir disso, o programa analisa as condições morfológicas de cada célula, diferenciando as células de pontos presentes no campo, como aglutinações, manchas, bactérias, entre outros. Diferenciando também células normais de células com anomalias morfológicas. O equipamento diferencia a porcentagem de células com patologia de células normais, não diferenciando os tipos de patologia (etapa a ser feita em microscopia óptica discernido por um operador) (SOUSA, 2007).

O sistema CASA oferece rapidez, objetividade e repetibilidade nas avaliações, o que possibilita detalhar melhor a qualidade do sêmen e fornecer informações adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozoides, as quais apresentam limitações a observação convencional (AMANN e KATZ, 2004).

As incidências de lesões na membrana intacta são avaliadas seguindo a metodologia de coloração eosina-nigrosina (BRITO, 2007). A eosina é um corante supra vital que, ao penetrar na membrana plasmática lesada, liga-se aos ácidos nucléicos, e confere uma coloração rosa ao espermatozoide lesado.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA CÉLULA ESPERMÁTICA

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), em condições normais, as ROS e os antioxidantes encontram-se em equilíbrio. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ROS e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Entre eles, podemos citar, a nutrição inadequada e a permanência dos animais em condições de estresse (ANDRADE, 2010). As ROS incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e altamente reativos, possuindo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005).

No ejaculado existem duas fontes principais de ROS, os espermatozoides e os leucócitos. Ambos possuem um mecanismo similar de geração de ROS (MAIA, 2006). Nos espermatozoides este estresse ocorre extra e intracelular e quando excede a capacidade dos antioxidantes disponíveis, o gameta fica altamente suscetível a danos (MAHFOUZ, 2010).

A mitocôndria é o principal local de produção das ROS (BARJA, 2007). Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa, o que implica em cinco complexos enzimáticos (BLIER et al., 2001). Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações REDOX (reduções oxidativas), tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Porém, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio consumido pela mitocôndria no complexo IV, é convertida em uma das várias ROS, em vez de água. Sendo a fosforilação oxidativa uma das principais responsáveis pela produção de ROS. Essas espécies são produzidas, ainda, por outras reações REDOX, como aquelas

envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos, por exemplo o caso da oxidase NADPH (DOWNLING e SIMMONS, 2009). A formação de radicais derivados do oxigênio em vários processos metabólicos exerce um papel importante no funcionamento do organismo. Eles são dose dependentes e, quando em baixas concentrações, são responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (DOWNLING e SIMMONS, 2009). As ROS passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes oxidantes.

Os três principais tipos de ROS são: superóxido (O2 -), peróxido de hidrogênio (H2O2) e hidroxila (OH°):

- Radical superóxido (O2 -): Radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. Também é produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas e são produzidos durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG & ARNÉR, 2001).
- Radical hidroxila (OH°): Considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, podendo ser capaz de causar mais danos do que qualquer outra ERO. Formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe++ ou Cu+), denominada reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001). O radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2): Não é um radical livre, mas sim um metabólito do oxigênio extremamente deletério, participando como intermediário na reação que produz o OH°, possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, o H2O2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutationa peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

A maioria dos seres vivos possui um eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas ROS que são formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios (DIAS, 2013).

Os espermatozoides produzem espontaneamente uma variedade de ROS. Estes produzidos em pequenas quantidades são funcionalmente importantes na condução da motilidade, hipermotilidade, reação acrossômica e capacitação espermática (ANDRADE, 2010; MAHFOUZ, 2010, GUTHRIE e WELCH, 2012; BARRANCO, 2014). No entanto, quando ocorre um excesso de produção, o espermatozoide entra em um estado de estresse oxidativo, que é caracterizado por danos na membrana plasmática e na integridade de DNA (AITKEN, 2010). O que inclui a perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (IRVINE et al., 2000; VALENÇA e GUERRA, 2007).

Na espécie suína, os espermatozoides são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo, devido a sua membrana plasmática ser rica em ácidos graxos poliinsaturados e ao conjunto de manipulação e processamento do ejaculado, que muitas vezes leva a um aumento nos níveis de ROS (CEROLINI, 2000). Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida (MAIA, 2006), logo, o conjunto desses fatores pode contribuir para a baixa qualidade do sêmen (BUCAK, 2010; GUTHRIE e WELCH, 2012). A utilização de antioxidantes parece ser uma forma eficiente de reduzir o estresse oxidativo não apenas *in vitro*, mas também *in vivo* e que vários antioxidantes têm provado esse efeito protetor contra o dano oxidativo no espermatozoide, assim melhorando os parâmetros seminais (BANSAL e BILASPURI, 2011).

1.5 FREQUÊNCIA DE COLETAS NA ESPÉCIE SUÍNA

A produção e a qualidade do sêmen são influenciadas por fatores ambientais, como a estação do ano (CORCUERA et al., 2002), raça (BORG et al., 1993), idade, fotoperíodo (SANCHO et al., 2004), ambiente e temperatura (CORCUERA et al., 2002), ingestão de alimentos, e tamanho de testículo (COLENBRANDER et al., 1993). Outro fator muito importante é a frequência de coletas, a qual determina a quantidade e qualidade do ejaculado e, o número de espermatozoides presentes nesse ejaculado (FRANGEZ et al., 2005).

Altas frequências de coleta de sêmen afetam a motilidade das células espermáticas, a concentração e a contagem total de espermatozoides, e ainda, resultam em proporções aumentadas de espermatozoides com morfologia anormal (STRZEZEK et

al., 1995). O volume do ejaculado e a concentração total de sêmen, são significativamente menores quando, os mesmos, são coletados em intervalos de 24 e 72 horas quando comparados com ejaculados coletados com intervalos de 120 horas (FRANGEZ et al., 2005).

Estudos relatam uma redução no número de espermatozoides por ejaculado em animais coletados com uma frequência de sete vezes na semana, provavelmente devido ao pouco tempo de amadurecimento, desses espermatozoides, no epidídimo. Porém, o volume da ejaculação não foi afetado pela maior frequência de coletas. Nesse mesmo estudo, animas coletados com uma frequência de três vezes por semana resultou em maior produção de espermatozoides e os animais mantiveram um maior nível de libido. A frequência de coletas de sete vezes na semana reduziu significativamente o número de espermatozoides na ejaculação, resultando em menor número de doses inseminantes. Além disso, a libido é significativamente menor em uma frequência de coleta de sete vezes na semana, o que pode constituir um fator limitante para a qualidade do espermatozoide (FRANGEZ et al., 2005).

Outro estudo, relatou uma diminuição da motilidade dos espermatozoides, da concentração total, e aumento de células espermáticas anormais e com membranas danificadas. A resistência osmótica dos espermatozoides também diminuiu indicando comprometimento da integridade de membrana (STRZEZEK et al., 1995). Os níveis de alguns marcadores bioquímicos medidos (atividade total de acrosina para o acrossoma, atividade de AspAT em espermatozóides para a peça intermediária, peroxidação lipídica (LPO) e o H-33258 (H0258) para o plasmolema) também foram alterados por altas frequências de coletas. Outros parâmetros, como atividade respiratória dos espermatozoides, com o aumento da frequência de coletas, pode ser afetada e levar a produção de um sêmen com uma viabilidade mais baixa (FÜLÖP, 1996). Porém, animais que permanecem sem ser coletados em intervalos superiores a uma semana apresentam diminuição da libido, no número total de espermatozoides e consequentemente no número de doses inseminantes produzidas (FRANGEZ et al., 2005).

Os espermatozoides com formação de cauda anormais se desenvolvem no ducto do epidídimo. As anomalias no número de cabeças e caudas são geralmente relacionadas à maturação defeituosa dos espermatozoides ao longo do ducto do epidídimo que pode levar à aglutinação do esperma, resultando em espermatozoides com múltiplas cabeças e caudas, ou à diminuição da estabilidade cefálica, resultando em cabeças isoladas. Uma alta frequência de coleta de sêmen traz um padrão alterado de reabsorção e secreção do

fluido do epidídimo, o que resulta em maturação defeituosa do esperma e desenvolvimento anormal da motilidade das células espermáticas (PRUNEDA et al., 2005).

1.6 IMPORTÂNCIA DO MACHO REPRODUTOR

A produção e seleção de machos reprodutores visando o melhoramento genético, obteve um grande destaque a partir da utilização da inseminação artificial (IA) (BROEKHUIJSE et al., 2012). A atividade sexual, o volume e a qualidade do sêmen produzido por esses machos reprodutores tornaram-se características importantes para a IA (WYSOKIŃSKA e KONDRACKI, 2014). O macho contribui com 50% do material genético de cada descendente, sendo assim, a quantidade e o desempenho de seus descendentes determinam o retorno econômico na suinocultura (HUGHES e VARLEY, 1980; BORTOLOZZO, 2005).

As Unidades Distribuidoras de Genética (UDG) alojam grande quantidade de machos de alto valor genético e produzem doses inseminantes em grande quantidade, seguindo critérios rigorosos. São responsáveis por inserir características genéticas desejáveis nos plantéis, com biosseguridade e uma máxima produtividade, através da rápida difusão de material genético (sêmen) (MAES et al., 2008). O sucesso do melhoramento genético depende também das granjas responsáveis pela criação e seleção dos machos reprodutores, denominadas, granjas núcleos e/ou multiplicadoras. (HARRIS; NEWMAN, 1994; HARRIS, 2000; KNOX, 2015).

Os machos são estimulados e treinados rotineiramente para montar no manequim, onde é realizada a coleta do sêmen utilizando-se a técnica da mão enluvada ou sistemas automatizados, onde o pênis é fixado no manequim (mais comuns em UDGs com uma rotina diária elevada de produção) (CASTRO et al., 2016). Os machos podem ser manejados para produzir de 20 a 40 doses de sêmen tradicional (inseminação artificial intracervical), contendo 2,5 a 3,0 bilhões de espermatozoides ou de 40 a 60 doses (inseminação artificial intrauterina), com 1,5 a 2,0 bilhões de espermatozoides (MOZO-MARTÍNA et al., 2012; KNOX, 2015). A inseminação artificial possibilita que machos geneticamente superiores produzam descendentes com até 200 fêmeas/ano, valor extremamente superior à monta natural, que alcança em média 20 fêmeas/ano (FÁVERO e FIGUEIREDO, 2009). Assim, é necessário implantar técnicas e manejos específicos

para os machos durante a seleção, bem como durante a criação, em granjas núcleos, multiplicadores ou comerciais (CASTRO et al., 2016).

A puberdade, no macho suíno, inicia-se entre 5 e 8 meses de idade, com a entrada em serviço em torno dos oito meses de idade A habilidade de montar e produzir ejaculados férteis são componentes importantes na decisão de utilizar um macho na reprodução, ocorrendo um aumento volume do ejaculado e no número total de espermatozoides gradual, entre 7 e 12 meses de idade (SCHEID & AFONSO, 2000).

1.7 SELEÇÃO E DESCARTE DE MACHOS REPRODUTORES

Os suínos reprodutores utilizados em programas de melhoramento genético são avaliados de uma maneira criteriosa através da sua genealogia, conformação, desempenho e progênie (CASTRO et al., 2016). Os machos são selecionados principalmente por meio de características de crescimento e carcaça (ROBINSON; BUHR, 2005) dando pouca ênfase para sua fertilidade, limitando a seleção com base no desenvolvimento reprodutivo e comportamental do animal (FLOWERS, 2008). A seleção desses animais é realizada, geralmente, quando eles atingem aproximadamente 150 dias de idade (FIGUEIREDO, 2013). A seleção dos machos jovens muitas vezes ocorre antes de o animal atingir sua maturidade sexual completa (SCHULZE et al., 2014).

A avaliação dos reprodutores é feita individualmente por profissionais capacitados e realizada de acordo com os critérios e/ou padrões de seleção da empresa responsável pela genética (CASTRO et al., 2016). A seleção por conformação é realizada por meio da avaliação visual do exterior dos machos, avaliando-se os aprumos, o aparelho genital e o desenvolvimento das áreas de maior interesse econômico (lombo, pernil e paleta) (ROBINSON; BUHR, 2005). O selecionador deve observar os defeitos que podem ocasionar o descarte do macho, como por exemplo: cegueira; problema de locomoção (aprumos); abscesso; criptorquidismo unilateral ou bilateral (ausência do testículo na bolsa escrotal); hipoplasia ou hiperplasia testicular; desvio da coluna vertebral (escoliose, lordose ou cifose) e sinais de lesões causadas por canibalismo (ROBINSON; BUHR, 2005; GAGGINI et al., 2008; FIGUEIREDO, 2013).

Exames andrológicos também devem ser realizados frequentemente para avaliar o sêmen e a capacidade reprodutiva do macho (BROEKHUIJSE et al., 2012). Todas essas avaliações possibilitam a precisão da seleção de cada característica reprodutiva, assim

como a recomendação de descartes ou reposição de acordo com o índice genético dos animais (ROBINSON; BUHR, 2005).

O melhoramento genético busca a produtividade, mas desconsidera características importantes de reprodução (FLOWERS, 2008). Por exemplo, a única resposta durante o treinamento dos machos para coleta de sêmen é a capacidade de montar no manequim, e quando isso não ocorre, o animal é descartado, muitas vezes sem determinar o motivo da dificuldade em realizar a monta (CASTRO et al., 2016). Não se sabe os motivos pelos quais alguns machos têm mais habilidade e montam rapidamente no manequim, enquanto outros são mais lentos ou muitas vezes não conseguem montar (LEVIS; REICKS, 2005).

Os principais motivos de descarte de machos reprodutores suínos estão associados ao melhoramento genético, falta de qualidade do sêmen, problemas de aprumos e falta de libido durante a coleta, com as taxas anuais de abate variando entre 20-70% (KNOX et al., 2003). Um estudo realizado em sete unidades de inseminação artificial na América do Norte e Europa verificou que de 1 a 20% dos machos são descartados por falta de libido, 20 a 45% ao melhoramento genético, 10 a 30% devido a qualidade do sêmen, 13 a 60% pela condição física do macho e 10 a 20% devido a outras causas (ROBINSON; BUHR, 2005).

Uma granja que apresenta uma baixa fertilidade de seu rebanho de machos, tende a apresentar uma redução nos índices de desempenho reprodutivo, podendo, a infertilidade dos machos ter um significativo efeito adverso sobre o desempenho reprodutivo (SANTOS et al., 2012). Preconiza-se, nas centrais de inseminação, utilizar práticas de descarte de machos inférteis, a partir de um exame clínico e reprodutivo, detectando o macho que apresentar insuficiência reprodutiva (CORRÊA, 1999).

Para determinar a causa dos baixos níveis de fertilidade dos machos, que incluem fatores que podem influenciar a qualidade e quantidade de sêmen produzido durante a sua vida útil, podemos citar a idade do macho, a frequência de coletas, a temperatura ambiental, a nutrição, a raça e outros fatores estressantes, destacando-se aqueles que afetam o estado sanitário dos reprodutores e os iatrogênicos, como os provocados por procedimentos errôneos na coleta, processamento e armazenamento do sêmen (CORRÊA, 1999).

O grande desafio na reposição de machos é conseguir ajustar uma taxa de reposição que proporcione um atraso genético compatível economicamente, de maneira que a distância entre os níveis da pirâmide de melhoramento genético não fique tão distante e a transferência dos genes selecionados nas granjas núcleos de melhoramento

genético sejam rapidamente incorporados aos planteis comerciais, com uma alta produção de sêmen (SANTOS et al., 2012). Machos mais maduros produzem uma quantidade maior de sêmen por coleta, porém a manutenção de machos por muito tempo no plantel comercial leva ao risco de se usar material genético ultrapassado o que ocasionaria numa diminuição da qualidade da dose inseminante (ANTUNES, 2007a).

Uma recomendação é utilizar os machos reprodutores por no máximo dois anos nas centrais de difusão genética, considerando que os mesmos entram em atividade a partir dos 240 dias de idade. Em algumas eventualidades pode-se reter algum macho por questões de manejo da Central por um tempo maior, mas, em hipótese alguma os machos devem ser mantidos com idade superior a três anos. (ANTUNES, 2007a).

1.8 TREINAMENTO PARA COLETA DE SÊMEN

Os machos reprodutores após serem selecionados são submetidos a um período de treinamento para coleta de sêmen que se inicia, geralmente, aos sete meses de idade, com uma duração de aproximadamente duas semanas para a maioria dos machos (KNOX, 2015).

O manequim, onde o macho irá realizar a monta, deve ser bem posicionado, firme, com altura compatível ao tamanho do macho e não podendo causar desconforto ou trauma ao animal. O piso deve estar seco, com um ambiente calmo e sem estresse para o macho (ABRAHÃO, 2006). O responsável pelo treinamento precisa ter experiência, paciência e ajudar o animal através de toques no manequim e com a emissão de sons para influenciá-lo a realizar a monta (ABRAHÃO, 2006). O horário para realização do treinamento também deve ser considerado, sendo realizado em períodos com temperaturas confortáveis, pois a atividade sexual pode ser influenciada pelo estresse por frio ou calor (SURIYASOMBOON et al., 2005). As seções de treinamentos devem ser de 15 a 20 minutos, não obtendo sucesso, o macho deverá retornar no dia seguinte (ABRAHÃO, 2006).

Deve ser realizada a higienização do prepúcio, a mesma consiste em retirar toda a secreção (urina e fluidos) depositada no local, com objetivo de reduzir a contaminação do sêmen (ABRAHÃO, 2006). O sêmen pode ser coletado de forma manual (técnica da mão enluvada), semiautomática ou automática. O macho não deve ser removido de cima do manequim, principalmente enquanto estiver ejaculando, pois isso pode prejudicar o comportamento sexual do animal (TONIOLLI, 2010). Um macho experiente, acostumado

com a rotina de coletas, poderá ser colocado na baia de coleta durante o treinamento para montar no manequim e ser observado por um macho inexperiente, auxiliando no aprendizado do macho principiante (RODRIGUES, 2013).

A boa relação entre os animais e o manejador/coletador durante o treinamento é importante para o sucesso na coleta de sêmen. As primeiras coletas de sêmen irão influenciar o comportamento sexual subsequente, por este motivo o animal deve ser supervisionado e auxiliado, se necessário (CASTRO et al., 2016). Situações de estresse devem ser evitadas principalmente no manejo de machos inexperientes, pois sabe-se que alguns machos precisarão de várias exposições ao manequim para entender sua finalidade (KNOX et al., 2003).

CAPÍTULO 2

MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido a Revista Ciência Rural, e apresentado de acordo com as normas da revista.

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

Frequency of semen-collections in boars at the beginning of reproductive life: evaluation of seminal parameters

Julianni Dornelles[I]* Carlos Augusto Rigon Rossi[II] Marcelo Soares[II] Cristian Guilherme Gräf[III] Luara Medianeira de Lima Schlösser[IV] Rodrigo Dalmina Rech[IV]

RESUMO

Na reprodução de suínos, com os avanços específicos em genética e demanda do mercado suinícola, há a necessidade de avaliar se é possível um maior aproveitamento dos animais jovens e, com isso aumentar a produção de doses inseminantes e maximizar sua vida útil nas centrais de inseminação artificial. O objetivo deste estudo foi identificar quais são os melhores intervalos entre coletas de sêmen de suínos reprodutores com nove meses de idade. Para isso, 20 suínos foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos (T): T1- intervalo entre coletas de dois dias; T2- intervalo entre coletas de três dias; T3- intervalo entre coletas de quatro dias e T4- intervalo entre coletas de sete dias. A partir dos ejaculados foram produzidas doses inseminantes, as quais foram avaliadas quanto ao volume, motilidade total, motilidade massal, concentração total, número total de células, morfologia, integridade de membrana e as substâncias reativas

[I] *Centro de Ciências Rurais, Departamento de Clínica de Grandes Animais; Campus Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria- Rs. E-mail: juliannidornelles@gmail.com. Autor para correspondência.
[II] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Clínica de Grandes Animais, Santa Maria, RS, Brasil.
[III] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Graduação em Zootecnia, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Santa Maria, RS, Brasil.
[IV] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Santa Maria, RS, Brasil.

ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no sêmen diluído em Vitassem®. As doses inseminantes foram avaliadas nas horas 0, 24, 72, 120 e 168. Foram realizadas, também, medidas testiculares (comprimento, largura e volume), semanalmente durante os 90 dias de experimento. O grupo T3 apresentou concentração espermática 5,6% ($p>0,05$), 37,04% ($p<0,05$) e 42,15% ($p<0,05$) superior se comparado ao T4, T2 e T1. A motilidade total do T4 foi superior em 0,79% ($p>0,05$), 2,02% ($p>0,05$) e 3,38% ($p<0,05$) se comparada ao T3, T2 e T1, respectivamente. O volume do testículo direito no T4 foi 18,48%, 23,14% e 34,46% superior ($p<0,05$) em relação ao T3, T2 e T1, respectivamente. Na avaliação da morfologia espermática para células normais, T4 foi superior ($p<0,05$) em 6,47%, 8,14% e 14,21% se comparada aos grupos T3, T2 e T1, respectivamente. O grupo T4 apresentou integridade de membrana plasmática normais superior ($p<0,05$) em 6,89%, 8,8% e 14,57 se comparado com T3, T2 e T1, respectivamente. E para as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o grupo T1 foi superior ($p<0,05$) em 6,58%, 12,52% e 10,03% em relação ao T2, T3 e T4, respectivamente. Esses resultados indicam que menores intervalos entre as coletas de sêmen, influenciam negativamente as características quantitativas e qualitativas das células espermáticas. O intervalo entre coletas de 3 e 4 dias proporciona os melhores resultados sobre a viabilidade espermática de suínos com nove meses de idade.

Palavras-chave: células espermáticas, doses inseminantes, intervalos entre coletas, parâmetros espermáticos.

ABSTRACT

In breeding pigs, with the specific advances in genetics and demand of the swine market, it is necessary to evaluate if it is possible to make the most use of the young animals, to increase the production of inseminating doses and maximize their useful life in the artificial insemination centers. Therefore, the objective of this study was to evaluate

the best intervals for the collection of semen from breeding pigs at the beginning of their reproductive life. For this, twenty pigs were randomly distributed in four treatments (T), being T1 - interval between collections of two days; T2- interval between collections of three days; T3- interval between collections of four days and T4- interval between collections of seven days (control). From the ejaculates, inseminating doses were produced, which were evaluated by volume, total motility, mass motility, total concentration, volume, total number of cells, morphology, membrane integrity and reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) in the semen diluted in Vitassem® The inseminated dose were evaluated at hours 0, 24, 72, 120 and 168) and testicular measurements (length, width, and volume). Group T3 presented a spermatic concentration of 5.6% ($p > 0.05$), 37.04% ($p < 0.05$) and 42.15% ($p < 0.05$) higher than T4, T2 and T1. The total motility of T4 was higher in 0.79% ($p > 0.05$), 2.02% ($p > 0.05$) and 3.38% ($p < 0.05$) than in T3, T2 and T1, respectively. The right testicle volume in the T4 was 18.48% ($p < 0.05$), 23.14% ($p < 0.05$) and 34.46% ($p < 0.05$) compared to T3, T2 and T1, respectively. In the evaluation of sperm morphology for normal cells, T4 was higher in 6.47% ($p < 0.05$), 8.14% ($p < 0.05$) and 14.21% ($p < 0.05$) when compared groups T3, T2 and T1. Group T4 had normal plasma membrane integrity ($p < 0.05$), 8.8% ($p < 0.05$) and 14.57 ($p < 0.05$) plasma membrane integrity when compared to T3, T2 and T1. And for the TBARS parameters, the T1 group was 6.58% ($p < 0.05$), 12.52% ($p < 0.05$) and 10.03% ($p < 0.05$) higher than the groups T2, T3 and T4, respectively. These results indicate that short intervals between semen collections negatively influence the quantitative and qualitative characteristics of sperm cells. The four day interval between collections provides the best results on sperm viability.

Key words: collection intervals, inseminanting, sperm cells, sperm parameters.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico e científico inserido na suinocultura atual proporcionou o aumento da produtividade e a busca constante por qualidade, agregação de valor ao produto final e bem-estar dos animais de produção. Atualmente, sabe-se que não bastam apenas bons padrões nutricionais e boas práticas de manejo no plantel como um todo. É necessário também que os índices reprodutivos sejam elevados, o que faz com que uma atenção especial seja dada ao plantel de reprodutores (CASTRO et al., 2016).

Com o crescimento do setor suinícola foi necessário a automatização, a qual gerou maior eficiência na produção de doses inseminantes em centrais de difusão genética. Neste aspecto, devemos considerar que as biotécnicas utilizadas buscam otimizar o material genético dos machos através da diminuição do número de células espermáticas por dose inseminante e do número de doses por inseminação. É interessante salientar que estudos demonstraram que os parâmetros espermáticos podem ser alterados pela frequência de coletas dos machos, o que determina a quantidade e a qualidade do ejaculado e o número de espermatozoides presentes nesse ejaculado (PRUNEDA et al., 2004). Assim, animais que não possuem uma rotina de coletas de sêmen, em intervalos regulares e de acordo com a idade, podem apresentar diminuição da libido, do número total de espermatozoides e consequentemente, no número de doses inseminantes produzidas (FRANGEZ et al., 2005).

Portanto, há necessidade de avaliar a possibilidade de reduzir o intervalo entre as coletas de sêmen, aumentar a produção de doses inseminantes viáveis e otimizar a vida útil dos machos nas centrais de inseminação artificial. O objetivo do estudo foi avaliar quais são os melhores intervalos entre coletas de sêmen de suínos reprodutores no início

da vida reprodutiva em relação as características quantitativas e qualitativas das células espermáticas no sêmen diluído em Vitassem®.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Unidade Distribuidora de Genética de São Carlos, oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, no período entre janeiro e abril de 2018, totalizando 90 dias de experimento. Foram utilizados 20 machos da genética Agroceres PIC, com 9 meses de idade. Certificados sanitariamente GRSC (Granja de Reprodutores Suínos Certificadas), alimentados na primeira hora da manhã, com ração para suínos reprodutores Nutri-Macho, 2,4 kg/animal/dia. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os machos divididos aleatoriamente nos tratamentos. Foram estudados quatro tratamentos (T): T1- intervalo entre coletas de dois dias; T2- intervalo entre coletas de três dias; T3- intervalo entre coletas de quatro dias e T4- intervalo entre coletas de sete dias.

As coletas de sêmen foram realizadas em manequins fixos, de altura regulável e sistema de coleta semiautomático. A partir dos ejaculados, foram produzidas doses inseminantes (DI), as quais foram avaliados o volume do ejaculado (mL), concentração espermática (sptz/mL), a motilidade total (%) e a motilidade massal (0 a 5), nas horas 0, 24, 72, 120 e 168 do estudo. O estresse oxidativo e integridade de membrana plasmática das DI foram avaliados nas horas 0, 72, 120 e 168. O teste de termorresistência (TTR) e a morfologia das células espermáticas foram avaliadas nas horas 72, 120 e 168. Os testículos foram avaliados em: comprimento, largura e volume do testículo direito bem como, comprimento, largura e volume do testículo esquerdo com auxílio de um paquímetro 150mm marca Mitutoyo®, semanalmente durante os 90 dias de experimento.

A avaliação dos parâmetros espermáticos foi realizada com auxílio do sistema CASA (Sistema de Análise Computadorizada de sêmen - Magavision®, Magapor), utilizando câmaras de contagem específicas do equipamento (câmara de contagem celular 125- mobilidade individual e massal: 5 análises por unidade).

As incidências de lesões na membrana intacta foram avaliadas seguindo a metodologia de coloração eosina-nigrosina (BRITO, 2007). Na interpretação foram considerados como espermatozoides lesionados, aqueles que apresentavam a membrana pigmentada. O mesmo foi feito para a avaliação da morfologia espermática, avaliando defeitos primários, secundários e terciários (DONATEU, 2004).

O teste de termorresistência (TTR), foi utilizado para avaliar a competência funcional dos espermatozoides quando submetidos a condições que simulam a temperatura corporal da espécie suína como descrito na literatura (TARDIF et al., 1999). O TBARS foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Cruz et al (2015), nas horas 0, 72, 120 e 168.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS Studio. As variáveis foram primeiramente submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Apresentando este pressuposto, foram submetidas a análise de variância e as diferenças entre as médias, comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 1, 2 e 3. A partir desses resultados, observamos que altas frequências de coletas em machos reprodutores no início da vida reprodutiva, afetam determinados índices da qualidade do sêmen como o volume,

a concentração espermática, a motilidade total, a morfologia e a integridade de membranas.

Na tabela 1 observa-se que a concentração espermática do T3 foi 5,6% ($p>0,05$), 37,04% ($p<0,05$) e 42,15% ($p<0,05$) superior se comparado aos grupos T4, T2 e T1, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos relatados por FRANGEZ et al. (2005), os quais observaram uma redução no número de espermatozoides por ejaculação em animais coletados com uma frequência de sete vezes na semana, provavelmente devido ao pouco tempo de amadurecimento dos espermatozoides no epidídimo. A concentração total de sêmen, conforme SWIERSTRA e DYCK (1976), foi relatada como sendo significativamente menor quando os ejaculados foram coletados em intervalos de 24 e 72 horas, resultados semelhantes ao grupo T1, com 72 horas de intervalo entre coletas, com uma menor concentração espermática em relação aos demais grupos. Segundo KEMP et al. (1998), maiores frequências de coletas resultam em aumento na produção de espermatozoides, mas sem efeito nos parâmetros de qualidade do sêmen. Não foi possível observar um aumento na produção espermática nos animais submetidos a menores intervalos entre coletas. Resultado também encontrado por FRANGEZ et al. (2005), que relatou que a frequência de coletas de sete vezes na semana reduziu significativamente o número de espermatozoides na ejaculação, resultando em menor número de doses inseminantes. Animas coletados com uma frequência de duas vezes por semana apresentaram maior produção de espermatozoides e maior taxa de libido (STRZEZEK et al., 1995). Assim como encontrado no grupo T3, que além de apresentar maior concentração de espermatozoides também apresentou uma excelente libido, superior aos demais grupos, principalmente ao grupo T1, no qual os machos necessitavam de um maior tempo junto ao manequim para realizar a monta. O que também foi descrito por FRANGEZ et al. (2005), que relatou que a libido é significativamente menor com

uma frequência de coleta de sete vezes na semana, o que pode constituir um fator limitante para a qualidade do espermatozoide.

A motilidade total (tabela 1) do T4 foi superior em 0,79% ($p>0,05$), 2,02% ($p>0,05$) e 3,38% ($p<0,05$) se comparada ao T3, T2 e T1, respectivamente. Além da diminuição da motilidade dos espermatozoides relatada no grupo T1, outros estudos também encontraram essa diminuição e constataram que poucos dias de intervalo entre coletas provoca redução da concentração total, aumento de células espermáticas anormais e com membranas danificadas (STRZEZEK et al., 1995). Entretanto, intervalos de coleta superiores a sete dias afetam negativamente a motilidade espermática no sêmen fresco (BROEKHUIJSE et al., 2012).

Na tabela 1, foi possível observar que as variáveis testiculares foram influenciadas pela frequência de coletas. O volume do testículo direito no grupo T4 foi superior ($p<0,05$) em 18,48%, 23,14% e 34,46% em comparação a T3, T2 e T1, respectivamente. A variável volume não apresentou diferenças ($p>0,05$). Mesmo sem diferenças ($p>0,05$), o T2 apresentou o volume testicular 15,75% superior em relação ao T3. Através desses resultados, podemos estimar que o T2 e o T3 pode ser uma boa opção para a rotina das Centrais de inseminação. Outros estudos observaram que o volume da ejaculação não foi afetado pela maior frequência de coletas (FRANGEZ et al., 2005), o que também foi observado em nosso estudo, todavia com menor número de coletas. Contudo, SWIERSTRA e DYCK (1976), observaram que o volume do ejaculado foi significativamente menor quando os ejaculados foram coletados em intervalos muito curtos.

Em relação a morfologia espermática (tabela 2), o grupo T4 foi superior ($p<0,05$) em 6,47%, 8,14% e 14,21% se comparada aos grupos T3, T2 e T1, respectivamente. Já na avaliação de células com alterações primárias o grupo T1 foi superior ($p<0,05$) em

27,6%, 58,75% e 188,63% quando comparado com T2, T3 e T4, respectivamente. Os resultados para as alterações secundárias apresentaram T1 superior ($p<0,05$) em 34%, 47,39% e 167,5% se comparada com T2, T3 e T4, respectivamente. E para as defeitos terciários, o grupo T1 foi 34,81% ($p>0,05$), 43,15% ($p>0,05$) e 176,9% ($p<0,05$) quando comparada com os grupos T2, T3 e T4, respectivamente. O gameta masculino produzido nos testículos é altamente polarizado, mas funcionalmente imaturo, o que requer uma diferenciação do espermatozoide no epidídimo para se tornar progressivamente móvel e adquirir capacidade de fertilização (OLSON et al., 2002). Este desenvolvimento é crucial para o processo e requer interação espermática com um ambiente luminal progressivamente variável regulado por atividades secretoras e absortivas específicas da região do epitélio do epidídimo (HINTON et al., 1995).

Os tratamentos T1 e T2 apresentaram maiores porcentagens de células com defeitos, sendo observado grande presença de defeitos de cabeça, peça intermediária, gota citoplasmática e cauda dos espermatozoides. Segundo STRZEZEK et al. (1995), os espermatozoides com formação de cauda anormais se desenvolvem no ducto do epidídimo. As anomalias no número de cabeças e caudas são geralmente relacionadas à maturação defeituosa dos espermatozoides ao longo do ducto do epidídimo que pode levar à aglutinação do esperma, o que resulta em espermatozoides com múltiplas cabeças e caudas, ou à diminuição da estabilidade cefálica com cabeças isoladas. Uma alta frequência de coleta de sêmen traz um padrão alterado de reabsorção e secreção do fluido do epidídimo, o que resulta em maturação defeituosa do esperma e desenvolvimento anormal da motilidade das células espermáticas (PRUNEDA et al., 2004). No presente estudo, animais submetidos a menores intervalos de coletas, apresentaram uma diferença significativa no número de espermatozoides com gota citoplasmática proximal, intermediária e distal, quando comparados a animais que foram submetidos a um maior

intervalo entre as coletas. Em seu estudo, PRUNEDA et al. (2004), relatou que machos submetidos a uma alta frequência de coletas, apresentaram espermatozoides com gotas citoplasmáticas proximais 40% maior que no grupo controle. O grupo T1 apresentou uma elevada porcentagem de gotas citoplasmáticas proximais e distais quando comparado aos grupos T3 e T4. Uma alta frequência de coleta de sêmen resulta em anomalias na migração de gotículas proximais. Conforme STRZEZEK et al. (1995), essas anomalias na maturação dos espermatozóides podem ser devido ao menor tempo de passagem no ducto epididimal, bem como a alterações no padrão de absorção e secreção do epitélio epididimal que causam alterações no equilíbrio de proteínas e íons do líquido epididimário interferindo no processo de maturação dos espermatozoides (STRZEZEK et al., 1995). Este fato pode caracterizar a grande quantidade de defeitos espermáticos encontrados no ejaculado dos machos com maiores frequências de coletas.

Machos reprodutores, submetidos a uma frequência de coleta a cada dois dias, durante 12 meses (sem períodos de descanso), produziram ejaculados com apenas 35% de espermatozoides móveis (BONET et al., 1991). Essa redução também foi relatada por STRZEZEK et al. (1995), em seu estudo, quando suínos reprodutores submetidos a uma coleta ao dia durante um período de 10 dias produziram ejaculados com 54-58% de motilidade dos espermatozoides.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da integridade de membrana plasmática, especificamente as normais, onde podemos observar que o grupo T4 foi superior ($p<0,05$) em 6,89%, 8,8% e 14,57% quando comparado aos grupos T3, T2 e T1, respectivamente. FÜLÖP (1996), observou que a resistência osmótica dos espermatozoides também diminuiu indicando comprometimento da integridade de membrana. Os níveis de alguns marcadores bioquímicos medidos também foram alterados por altas frequências de coletas (FÜLÖP, 1996). Outros parâmetros, como

atividade respiratória dos espermatozoides, com o aumento da frequência de coletas, podem ser afetados e levar a produção de um sêmen com uma viabilidade reduzida (FRANGEZ et al., 2005).

Os resultados obtidos para as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tabela 2, demonstram que o grupo T1 foi 6,58% ($p<0,05$), 12,52% ($p<0,05$) e 10,03% ($p<0,05$) superior que os grupos T2, T3 e T4, respectivamente. Animais submetidos a um ritmo mais intenso de coletas, apresentaram maiores danos oxidativos em suas células espermáticas. Segundo ANDRADE (2010) o estresse oxidativo em espermatozoides é induzido por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa antioxidante. Nos espermatozoides este estresse ocorre extra e intracelular e quando excede a capacidade dos antioxidantes disponíveis, o gameta fica altamente suscetível a danos (MAHFOUZ, 2010). O grupo submetido a um menor intervalo entre coletas (T1) apresentou uma maior produção de ROS, provavelmente devido ao excesso de coletas, pois quando ocorre um excesso de produção, o espermatozoide entra em um estado de estresse oxidativo, que é caracterizado por danos na membrana plasmática e na integridade de DNA (AITKEN, 2010), o que inclui a perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático, mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (IRVINE et al., 2000; VALENÇA e GUERRA, 2007).

Os resultados obtidos para os parâmetros do TBARS são apresentados na tabela 2, e demonstram que o grupo T1 foi superior ($p<0,05$) em 6,58%, 12,52% e 10,03% em relação aos grupos T2, T3 e T4, respectivamente. Estes resultados demonstram que os animais submetidos a um ritmo mais intenso de coletas, apresentaram maiores danos oxidativos em suas células espermáticas. Segundo ANDRADE (2010) o estresse oxidativo em espermatozoides é induzido por um desequilíbrio entre a produção de

espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa antioxidante. Nos espermatozoides este estresse ocorre extra e intracelular e quando excede a capacidade dos antioxidantes disponíveis, o gameta fica altamente suscetível a danos (MAHFOUZ, 2010). Em nosso estudo, o grupo submetido a um menor intervalo entre as coletas (T1) apresentou uma maior produção de ROS, provavelmente devido ao excesso de coletas, pois quando ocorre um excesso de produção, o espermatozoide entra em um estado de estresse oxidativo, que é caracterizado por danos na membrana plasmática e na integridade de DNA (AITKEN, 2010). O que inclui a perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (IRVINE et al., 2000; VALENÇA e GUERRA, 2007).

Os machos submetidos aos intervalos entre coletas de 3 e 4 dias obtiveram melhores resultados para classificarmos qual a melhor frequência entre coletas para machos no início da vida reprodutiva com a finalidade do maior aproveitamento desses animais na central de inseminação. Constatamos que animais jovens podem ser coletados com intervalos de 3 e 4 dias sem comprometer seu ejaculado e consequentemente a produção de doses inseminantes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que machos suínos com nove meses de idade podem ser submetidos a um intervalo entre coletas de 3 e 4 dias, sem comprometer as características e a qualidade de suas células espermáticas. Portanto, estes intervalos podem ser utilizados para o maior aproveitamento dos animais jovens e com isso aumentar a produção de doses inseminantes maximizando sua vida útil nas centrais de inseminação artificial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Bretanha Importações e Exportações Ltda, assim como a Unidade Distribuidora de Genética (UDG) de São Carlos, pela disponibilidade das instalações, área laboratorial para realização de análises e dos animais para execução do trabalho, ao Laboratório de Pesquisa de Patologia Clínica Veterinária da UFSM, pelo auxílio com as análises de estresse oxidativo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA (Aprovado e protocolado sob o CEUA 4076090318).

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995. Available from: <http://www.publish.csiro.au/rd/RD9950659 > Accessed: Dez. 02, 2018. doi: 10.1071/RD9950659.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos

antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-86, 2010. Available from: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v<34n2/p79-86.pdf>. Accessed: Dez. 02, 2018.

BONET, S.; BRIZ, M.; FRADERA, A. The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies. **Scientia Gerundensis**, 17:77-84. 1991. Available from: < https://core.ac.uk/download/pdf/132552304.pdf> Accessed: Dez. 02, 2018.

BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/213862584_Evaluation_of_Stallion_Sperm_Morphology>. Accessed: Dez. 02, 2018. doi: 10.1053/j.ctep.2007.09.004.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J. *et al.* The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v. 77, p. 1466-1479, 2012. Available from: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11006157> Accessed: Dez. 02, 2018. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.016.

CASTRO, A. C. D. **Comportamento e desempenho sexual de suínos reprodutores criados em ambientes enriquecidos**. 2016. 154f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade de São Paulo.

CRUZ, D. F.; LUME, C.; SILVA, J. V.; NUNES, A.; CASTRO, I.; SILVA, R.; SILVA, V. Oxidative stress markers: Can they be used to evaluate human sperm quality? **Turkish Journal of Urology**, 41(4): 198-207. 2015. Available from: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4621148/>. Accessed: Dez. 08, 2018. doi: 10.5152/tud.2015.06887.

DONADEU, M. Advances in male swine artificial insemination (AI) techniques. **The Pig Journal**, 54: 110-122, 2004. Accessed: Dez. 02, 2018.

FRANGEZ R.; GIDER T.; KOSEC M. Frequency of Boar Ejaculate Collection and its Influence on Semen Quality, Pregnancy Rate and Litter Size. **Acta Veterinaria Brno**, 74:265-273. 2005. Available from: < https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2005074020265.pdf > Accessed: Dez. 08, 2018.

FÙLÖP L. Influence of collection frequency on respiratory activity of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, 31:241-242. 1996. Available from: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00033.x> Accessed: Dez. 08, 2018. doi: 10.1111/j.1439-0531.1995.tb00033.x.

HINTON, B. T.; PALLADINO, M. A. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. **Microscopy Research Technique**, 30:67-81. 1995. Available from: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.1070300106 > Accessed: Dez. 08, 2018. doi: 10.1002/jemt.1070300106.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J.; GORDON, E.; FULTON, N.; MILENE, P.; AITKEN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **Journal of Andrology**, v.21, p. 33-44, 2000. Available from: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03273.x>. Accessed: Dez. 03, 2018. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03273.x.

KEMP B, GROOTEN H.J.G, HARTOG L.A, LUITING P, VERSTEGEN M.W.A. The effect of a high protein intake on sperm production in boars at two semen collection frequencies. **Animal Reproduction Science**, 17:103-113. 1998. Available from: < https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/201968#page=31>. Accessed: Dez. 03, 2018.

LARSSON, K.; ERSMAR, M. Laboratory studies on frozen-thawed boar semen in relation to contemporary fertility with liquid semen of AI boars. **Zuchthygiene**, v.15, p.111-117, 1980. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.1980.tb00495.x/full>. Accessed: Dez. 03, 2018. doi: 10.1111/j.1439-0531.1980.tb00495.x.

MAHFOUZ, R. Z.; DU PLESSIS, S. S.; AZIZ, N. et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 814-821, 2010. Available from: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028208044130>. Accessed: Dez. 03, 2018.

OLSON, G. E., NAGDAS, S. K., WINFREY, V. P. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: Robaire B, Hinton BT, editors. **The epididymis: from molecules to clinical practice**. p. 371-387. 2002. Available from: < https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-0679-9_21> Accessed: Dez. 03, 2018.

PRUNEDA A. et al. 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. 2005. Available from: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003577> Accessed: Dez. 03, 2018. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.10.009.

STRZEZEK J, KORDAN 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**, 30:85-94. 1995. Available from: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-

0531.1995.tb00609.x > Accessed: Dez. 03, 2018. doi: 10.1111/j.1439-0531.1995.tb00609.x.

SWIERSTRA E., DYCK G.W. Influence of the boar and ejaculation frequency on pregnancy rate and embryonic survival in swine. **Journal of Animal Science**, v. 42, p. 455-460, 1976. Available from: < https://academic.oup.com/jas/article-abstract/42/2/455/4699516 > Accessed: Dez. 08, 2018. doi: 10.2527/jas1976.422455x.

TARDIF, S. et al. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. **Theriogenology**, v.52, p.447-459, 1999. Available from: <http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(99)00142-9/pdf>. Accessed: Dez. 02, 2018. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00142-9.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p.47-53, 2007.

Tabela 1. Efeito de diferentes frequências de coletas em relação aos parâmetros espermáticos e tamanho testicular (média ±erro padrão da média) de machos suínos com 9 meses de idade.

Parâmetros	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Volume (mL)	157,53±5,69	165,23±9,98	142,74±6,10	141,32±7,67
C (sptz/mL)	210,67±9,86[b]	218,52±16,96[b]	299,47±19,94[a]	283,58±14,24[a]
MT (%)	80,57±1,13[b]	81,65±1,31[a]	82,84±1,46[a]	83,30±1,73[a]
MM (0 a 5)	4,88±0,06[b]	4,83±0,08[ab]	4,74±0,10[b]	5,15±0,08[a]
MT - TTR (%)	60,06±0,45[c]	63,52±0,53[ab]	61,85±0,56[bc]	65,08±0,59[a]
Largura TD (cm)	6,60±0,10[c]	6,74±0,07[bc]	6,91±0,04[b]	7,19±0,04[a]
C TD (cm)	11,17±0,14[c]	11,92±0,08[b]	11,92±0,09[b]	12,83±0,09[a]
V TD (cm)	263,03±10,76[c]	287,20±7,91[bc]	298,55±6,49[b]	353,68±8,05[a]
L TE (cm)	6,65±0,10[b]	6,69±0,08[b]	6,86±0,04[b]	7,10±0,03[a]
C TE (cm)	11,24±0,13[c]	11,90±0,08[b]	11,90±0,09[b]	12,68±0,08[a]
V TE (cm)	268,57±10,86[b]	285,75±8,62[b]	295,58±6,34[b]	336,23±5,63[a]

T1= dois dias de intervalo entre coletas; T2= três dias de intervalo entre coletas; T3= quatro dias de intervalo entre coletas; T4= sete dias de intervalo entre coletas; MT= Motilidade Total; MM= Motilidade Massal; C= Concentração espermática; TD= testículo direito; C TD= comprimento testículo direito; V TD= Volume testículo direito; L TE= largura testículo esquerdo; C TE= comprimento testículo esquerdo; V TE= volume testículo esquerdo;*Linhas diferentes entre colunas indicam que diferem estatisticamente no teste de Tukey ($p<0,05$) e no teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$) (Largura TE).

Tabela 2. Parâmetros de viabilidade espermática de células normais e com alterações e estresse oxidativo (TBARS) nos diferentes tratamentos de machos suínos com 9 meses de idade.

Tratamentos/ Variáveis	T1(%)	T2(%)	T3(%)	T4(%)	P
IM normais (%)	80,70[c]	84,98[b]	86,50[b]	92,46[a]	<0,0001
SPTZ normais (%)	81,76[d]	86,35[c]	87,70[b]	93,38[a]	<0,0001
D. P (%)	2,54[a]	1,99[b]	1,60[c]	0,88[d]	0,0001
D. S (%)	5,94[a]	4,43[b]	4,03[b]	2,22[c]	<0,0001
D. T (%)	9,72[a]	7,21[b]	6,79[b]	3,51[c]	<0,0001
TBARS (%)	$6,47e^{-09a}$	$6,07e^{-09b}$	$5,75e^{-09b}$	$5,88e^{-09b}$	<0,0001

[a, b, c e d] Letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis ($p<0,05$). IM: Integridade de Membrana, SPTZ: Espermatozoide, D. P: Defeitos Primários, D. S: Defeitos Secundários e D. T: Defeitos Terciários. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 3. Parâmetros de viabilidade espermática de células normais e com alterações e estresse oxidativo (TBARS) entre os diferentes intervalos de análise dos tratamentos de machos suínos com 9 meses de idade.

Int. Análise/ Variáveis	H0	H72	H120	H168	P
IM normais (%)	87,60[a]	86,61[ab]	85,67[bc]	84,76[c]	<0,0001
SPTZ normais (%)	-	88,39[a]	87,26[b]	86,24[b]	<0,0001
D. P (%)	-	1,64[a]	1,76[b]	1,86[b]	0,0001
D. S (%)	-	3,75[a]	4,16[b]	4,56[b]	<0,0001
D. T (%)	-	6,24[a]	6,83[b]	7,35[b]	<0,0001
TBARS (%)	6,07E-9	5,79E-9	5,90E-9	6,41E-9	0,1274

[a, b, c e d] Letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05). IM: Integridade de Membrana, SPTZ: Espermatozoide, D. P: Defeitos Primários, D. S: Defeitos Secundários e D. T: Defeitos Terciários. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelam que machos suínos no início da vida reprodutiva podem ser submetidos a um intervalo entre coletas de 3 e 4 dias, sem comprometer as características e a qualidade de suas células espermáticas. Portanto, estes intervalos podem ser utilizados para o maior aproveitamento dos animais jovens e com isso aumentar a produção de doses inseminantes e maximizar sua vida útil nas centrais de inseminação artificial.

REFERÊNCIAS

AALBERS, J. G.; MANN, T.; POLGE, C. Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v. 2, p. 42-53, 1961.

ABIPECS. **Relatório 2017/2018**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2018_pt.pdf>. Acessado em: 09/12/18.

ABRAHÃO, A. A. F. **Vitamina A na nutrição de cachaços**: I - Fatores relacionados ao condicionamento de machos reprodutores suínos para a colheita de sêmen. II - Análise qualitativa e quantitativa do sêmen de cachaços submetidos à suplementação de vitamina A na dieta. 2006. 125p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2006.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproduction Biologic Endocrinologic**, v. 3:28, 2005.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M. et al. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415-2426, 2010.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25. n. 3. p. 317-325, 2004.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-86, 2010.

ANTUNES, R. C. Planejando a Reposição de Reprodutores (Macho e Fêmea) e Impacto sobre a Eficiência Reprodutiva da Granja. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, MG, v. 31, n.1, p.41-46, jan./mar. 2007a.

AREND, L. S.; MAGNABOSCO, D.; WENTZ, I. et al. Avaliação do custo de doses inseminantes suínas em diferentes cenários. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 116-120, 2014.

ASHDOWN, R. R.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Masculina. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 6. ed. p. 03-20. 1996.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**. v. 11. 2010. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/>. Acesso em: 9 dez. DOI: 10.4061/2011/686137. 2018.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Research**, v. 10, p. 215-223, 2007.

BARRANCO, I.; ROCA, J.; TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Measurement of activity and concentration of Paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. **Molecular Reproduction & Development**, v. 82, p. 58-65, 2014.

BLIER, P. U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R. S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends Genetic**, v. 17, p. 400-406, 2001.

BORG, K. E.; LUNSTRA, D. D.; CHRISTENSON, R. K. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature Duroc, Meishan, Fengjing, and Minzhu boars. **Biology of Reproduction**, 49:515-521, 1993.

BORTOLOZZO, F. P. Exame do ejaculado. In: **Suinocultura em ação**: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. 1ª ed. Porto Alegre: Palloti, 2005a. v. 2. cap. 7. p. 69-89.

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

BRACKETT, B. G. Reprodução em mamífROS do sexo masculino. In: REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 12. ed. p. 623-643. 2014.

BRINSKO, S. P. Reproductive physiology of the male. In: CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. **Veterinary Physiology**. St Louis: Saunders Elsevier. 4. ed. p. 517-527. 2007.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

BROEKHUIJSE, M. L.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 32, n. 3-4, p. 151-157, 2012.

BUCAK, M. N.; SARIOZKAN, S.; TUNCER, P. B. et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 1, p. 24-30, 2010.

CASTRO, A. C. D. **Comportamento e desempenho sexual de suínos reprodutores criados em ambientes enriquecidos**. 2016. 154f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade de São Paulo.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99-111, 2000.

CIERESZKO, A.; OTTOBRE, J. S.; GLOGOWSKI, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. **Animal Reproduction Science**, 64: 89-96, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed. Belo Horizonte: CBRA. p. 104. 2013.

COLENBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H. J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. **Journal of Reproduction and Fertillity Supplement**, 48:207-215, 1993.

CORCUERA, B. D.; HERNANDEZ-GIL, R.; ALBA ROMERO, C. D.; MARTIN RILLO, S. Relationship of environment temperature and boar facilities with seminal quality. **Livestock Production Science**, 74:55-62. 2002.

CORRÊA, M. N.; MEINCKE, W.; LUCIA, JR. T. et al. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 181p. 2001.

CORRÊA, M. N. Manejo Reprodutivo do Macho Suíno UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA - FAEM. Disponível: http://www.ufpel.tche.br/pigpel/publicacoes/1999/1999_12.pdf. 1999.

CUPPS, T. P. **Reproduction domestic animal**. 4. Ed. San Diego: Academic press. Inc, 670p, 1991.

DIAS, A. V. **Ação de substâncias antioxidantes e a influência da ambiência sobre a qualidade do sêmen suíno**. 2013, 91p. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal.) - Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2013.

DOWNLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.276, p.1737-1745, 2009.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.

FIGUEIREDO, E. A. P. Melhoramento genético de suínos: o exemplo americano. In: GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A. (Org.). **Tópicos atuais na produção de suínos e aves**. Pelotas: IFSul/ Pelotas, 2013. p. 160-190.

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

FRANGEZ, R.; GIDER, T.; KOSEC, M. Frequency of Boar Ejaculate Collection and its Influence on Semen Quality, Pregnancy Rate and Litter Size**. Acta Veterinaria Brno**, 74:265-273. 2005.

FRANDSON, R.; LEE WILKE, W.; FAILS, A. Anatomy and Physiology of Farm Animals. 7 edição. 2009.

FÙLÖP L. Influence of collection frequency on respiratory activity of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, 31:241-242. 1996.

GAGGINI, T. S.; MURGAS, L. D. S.; ZANGERONIM, M. G. **Seleção de reprodutores suínos**. Lavras: Editora UFLA, 2008 (Boletim Técnico) - nº 81, p. 1-14.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 6. ed. p. 167-190.1996.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema reprodutor masculino. In: GARTNER, L. P.; HIATT, J. L **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2. ed. p. 402-418. 2003.

GONZÁLEZ, F. H. D. Introdução a endocrinologia reprodutiva veterinária. Porto Alegre: **UFRGS**, 87p, 2002.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708, 2012.

HAFEZ, E. S. E. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, p. 59-94, 1995.

HARRIS, D. L.; NEWMAN, S. Breeding for profit: synergism between genetic improvement and livestock production (a review). **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 8, p. 2178-2200, 1994.

HARRIS, D. L. Multi-site pig production. **Ames: Iowa State University Press**, 2000.
HEMSWORTH, P. H.; TILBROOK, A. J. Sexual behavior of male pigs. **Hormones and Behavior**, Nova York, v. 52, n. 1, p. 39-44, 2007.

HUGHES, P. E.; VARLEY, M. A. Reproduction in the Pig. **Butterworths**, Londres, 241 p. 1980.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J.; GORDON, E.; FULTON, N.; MILENE, P.; AITKEN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **Journal of Andrology**, v.21, p. 33-44, 2000.

KNOX, R. The **Anatomy and Physiology of Sperm Production in Boars**. Department of Animal Sciences. University of Illinois, p. 11, 2003.

KNOX, R.V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, Stoneham, v. 85, n. 1, p. 83-93, 2015.

KOZINK, D. M.; ESTIENNE, M. J.; HARPER, A. F.; KNIGHT, J. W. The effect of lutalyse on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 5, p. 1039-1045, 2002.

LEVIS, D. G.; REICKS, D. L. Assessment of sexual behavior and effect of sêmen collection pen design and sexual stimulation of boars on behavior and sperm output: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 630–642, 2005.

LOVE R. J, EVANS G, KLUPIEC C. An interaction between feeding rate and season affects fertility of sows. **Journal of Reproduction and Supplement**, 48:191-206. 1993.

MAES, D.; NAUWYNCK, H.; RIJSSELAERE, T.; MATEUSEN, B.; VYT, P.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, 2008.

MAHFOUZ, R. Z.; DU PLESSIS, S. S.; AZIZ, N. et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 814-821, 2010.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006. 185p Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu. 2006.

MARTINS, S. M. M. K.; SANTOS, S. F. A.; VIANA, W. L.; ABRAHÃO, A. A. F.; MORETTI, A. M. Aspectos básicos do jovem reprodutor para uma melhor vida útil reprodutiva. Pork Work, v. 21, p. 30-32, 2004.

MATOS, D. L. **Sobrevivência in vitro e fertilidade do sêmen suíno diluído a diferentes taxas de diluições e conservado a 17ºC.** 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal) - Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2008.

MOZO-MARTÍN, R.; GIL, L.; GÓMEZ-RINCÓN, C. F.; DAHMANI, Y.; GARCÍATOMÁS, M.; ÚBEDA, J. L.; GRANDÍA, J. Use of a novel double uterine deposition artificial insemination technique using low concentrations of sperm in pigs. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 193, n. 1, p. 251-256, 2012.

NORDBERG, J. & ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p.1287-1312, 2001.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D. S.; LIMA, D. et al. Alterações endócrinas em reprodutores suínos de alto desempenho: Relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**. v.

11, n. 1, 2010. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/ index.php/vet/article/view/1769/8120>. Acesso em: 29 nov. 2018. DOI: 10.5216/cab.v11i1.1769.

PRUNEDA, A. 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. 2005.

RIESENBECK, A. Review on international trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**. 46 (Suppl. 2), 1–3. 2011.

ROBINSON, J. A. B.; BUHR, M. M. Impact of genetic selection on management of boar replacement. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 668-678, 2005.

RODRIGUES, L. C. A. Potencialize o valor genético. Treine o reprodutor para a coleta de sêmen. **AGPIG Tecnologia e Gestão**. Rio Claro, 6 p. 2013.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p. 514-535, 2005.

SANCHO S, PINART E, BRIZ M, GARCIA-GIL N, BADIA E, BASSOLS J, KADAR E, PRUNEDA E, BUSSALLEU E, YESTE M, COLL MG, BONET S. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. **Theriogenology**, 62:1271-1282. 2004.

SANTOS, S. F. Ciclos reprodutivos e coberturas em suínos - machos e fêmeas. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 5, Ed. 192, Art. 1290, 2012.

SCHEID, I. R.; AFONSO, S. B. Treinamento e manejo de machos suínos jovens e adultos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 7, 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Piracicaba, p.29-39. 2000.

SCHULZE, M.; BUDER, S.; RÜDIGER, K.; BEYERBACH, M. WABERSKI, D. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 148, n. 3, p. 164-170, 2014.

SEAB. **Análise da Conjuntura Agropecuária**. In: (Ed.). Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Suinocultura. 2013. Disponível em: http://www. agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2017_2018.pdf. Acesso em: 9 dez. 2018.

SENGER, P. The organization and function of the male reproductive system. In. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, Inc, p. 44-79. 2003.

SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D. E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press. 2. ed., v. 1. p. 1063-1143. 1993.

SOUSA, D. B. **Variabilidade das subpopulações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**.2007. 122p. Tese (doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2007.

STRZEZEK, J.; KORDAN, 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**, 30:85-94. 1995.

SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; KUNAVONGKRIT, A.; EINARSSON, S. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 67, n. 8, p. 777-785, 2005.

TONIOLLI, R. Recentes avanços na tecnologia de sêmen e em inseminação artificial em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 105-113. 2010.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p.47-53, 2007.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

WYSOKIŃSKA, A.; KONDRACKI, S. Assessment of sexual activity levels and their association with ejaculate parameters in two-breed hybrids and pure-bred Duroc and Pietrain boars. **Annals of Animal Science**, Siedlce, v. 14, n. 3, p. 559-571, 2014.